

(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP978 U.S. PTO
10/032794
12/27/01

This is to certify that the annexed is a true copy of
the following application as filed with this Office.

Date of Application: December 27, 2000

Application Number: Japanese Patent Application
No. 2000-399155

Applicant(s): DNA Chip Research Inc.
Hitachi Software Engineering Co., Ltd.

November 26, 2001

Commissioner,
Patent Office

Kozo OIKAWA (seal)

Certificate No. 2001-3103650

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

#3/



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2000年12月27日

出願番号
Application Number:

特願2000-399155

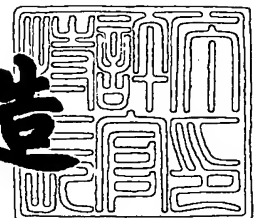
出願人
Applicant(s):

株式会社ディーエヌエイチップ研究所
日立ソフトウエアエンジニアリング株式会社

2001年11月26日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3103650

【書類名】 特許願

【整理番号】 12A139

【提出日】 平成12年12月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明の名称】 遺伝子配列を検出するリボザイム

【請求項の数】 21

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134番 株式会社
ディーエヌエイチップ研究所内

【氏名】 小松 康雄

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134番 株式会社
ディーエヌエイチップ研究所内

【氏名】 大塚 栄子

【特許出願人】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134番

【氏名又は名称】 株式会社 ディーエヌエイチップ研究所

【代表者】 松原 謙一

【特許出願人】

【識別番号】 000233055

【氏名又は名称】 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091096

【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子配列を検出するリボザイム

【特許請求の範囲】

【請求項1】 オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによるステムループ三次元構造の変化により活性化されることを特徴とするヘアピン型リボザイム。

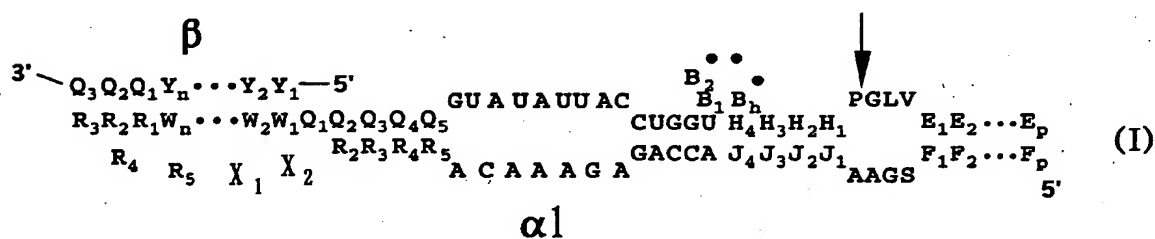
【請求項2】 オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション形成が3～23個の塩基対で構成される、請求項1に記載のヘアピン型リボザイム。

【請求項3】 オリゴヌクレオチドが標的塩基配列の一部であることを特徴とする、請求項1または2に記載のヘアピン型リボザイム。

【請求項4】 シス型リボザイムであり、活性化によって最初に自己切断することを特徴とする、請求項1から3のいずれか1項に記載のヘアピン型リボザイム。

【請求項5】 一般式 (I) または (II) にオリゴヌクレオチドとの複合体構造を示す、請求項4に記載のヘアピン型リボザイム。

【化1】



〔式中、 $\alpha 1$ がリボザイム、 β がオリゴヌクレオチドの配列をそれぞれ示す。〕

Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、

B1～Bh、E1～Ep、H1～H4、Q1～Q5、W1～Wn、X1及びX2はそれぞれ同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、

F1～Fp、J1～J4、R1～R5、及びY1～Ynは、それぞれE1～Ep、H1～H4、Q1～Q5、及びW1～Wnに相補的なヌクレオチドを表し、

Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

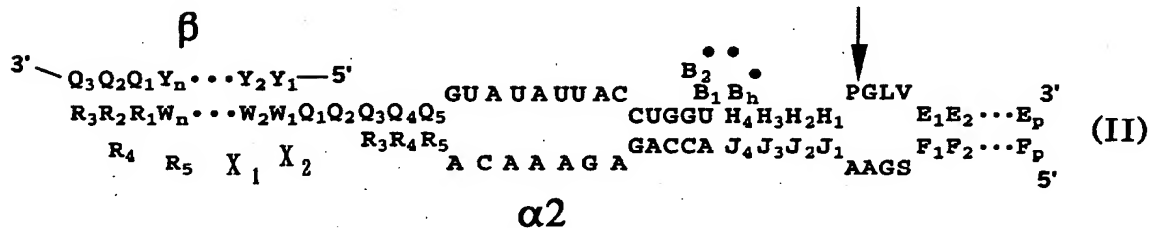
Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、

Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

hは3～20の整数、nは1～10の整数、pは1～10の整数をそれぞれ表す)。]

【化2】

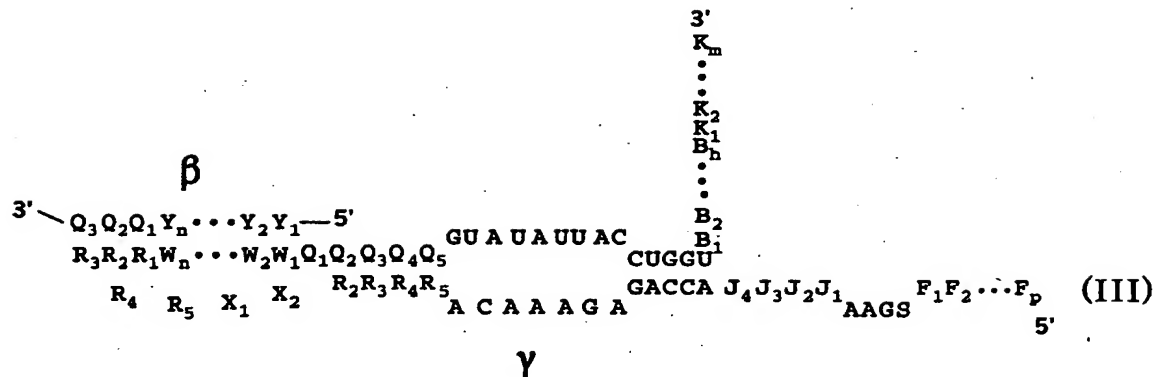


[式中、 $\alpha 2$ がリボザイム、 β がオリゴヌクレオチドの配列をそれぞれ示す。式中の記号は一般式(I)と同じ意味を示す。]

【請求項6】 トランス型リボザイムであり、活性化によって他のリボヌクレオチド配列を切断することを特徴とする、請求項1または2に記載のヘアピン型リボザイム。

【請求項7】 一般式(III)にオリゴヌクレオチドとの複合体構造を示す、請求項6に記載のヘアピン型リボザイム。

【化 3】



〔式中、 γ がリボザイム、 β がオリゴヌクレオチドの配列をそれぞれ示す。

U はウラシルヌクレオチド、C はシトシンヌクレオチド、A はアデニンヌクレオチド、G はグアニンヌクレオチドを表し、

B1 ~ Bh、F1 ~ Fp、J1 ~ J4、K1 ~ Km、Q1 ~ Q5、W1 ~ Wn、X1 及び X2 はそれぞれ同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、

R1 ~ R5、及び Y1 ~ Yn は、それぞれ Q1 ~ Q5、及び W1 ~ Wn に相補的なヌクレオチドを表し、

S はアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

h は 3 ~ 20 の整数、m は 1 ~ 10 の整数、n は 1 ~ 10 の整数、p は 1 ~ 10 の整数をそれぞれ表す) 。

【請求項 8】 請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のヘアピン型リボザイムを構成するリボヌクレオチドをコードする DNA。

【請求項 9】 請求項 8 に記載の DNA を含有する組み換えベクター。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の組み換えベクターを導入した宿主細胞。

【請求項 11】 オリゴヌクレオチドと不活性化型リボザイムのハイブリダイゼーションによってステムループ三次元構造を変化させることを特徴とする、ヘアピン型リボザイムの活性化方法。

【請求項 12】 オリゴヌクレオチドの 1 または 2 以上のヌクレオチドが 2'-O-メチル化されていることを特徴とする、請求項 11 に記載のヘアピン型リボザイムの活性化方法。

【請求項 1 3】 請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のヘアピン型リボザイムによる標的塩基配列の検出方法。

【請求項 1 4】 DNAチップ上に含まれるサンプルにおける標的塩基配列の存在を検出することを特徴とする、請求項 1 3 に記載の検出方法。

【請求項 1 5】 請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のヘアピン型リボザイムの自己切断によって切断された断片を検出することを特徴とする、標的塩基配列の検出方法。

【請求項 1 6】 蛍光色素、放射性標識によって切断断片を検出することを特徴とする、請求項 1 3 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の検出方法。

【請求項 1 7】 請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のヘアピン型リボザイムを含むことを特徴とする、サンプル中の標的塩基配列検出キット。

【請求項 1 8】 請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のヘアピン型リボザイムを用いることを特徴とする、リボヌクレオチド配列の切断方法。

【請求項 1 9】 請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のヘアピン型リボザイムとオリゴヌクレオチドを別に投与することを特徴とする、請求項 1 8 に記載の切断方法。

【請求項 2 0】 オリゴヌクレオチドの 1 または 2 以上のヌクレオチドが 2'-O-メチル化されていることを特徴とする、請求項 1 7 または 1 8 に記載の切断方法。

【請求項 2 1】 請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のヘアピン型リボザイムを含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによるステムループ三次元構造の変化により活性化されるヘアピン型リボザイム、該リボザイムを構成するリボヌクレオチドをコードするDNA、該DNAを含有する組み換えベクター、該組み換えベクターを導入した宿主細胞、上記リボザイムによる標的塩基配列の検出方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】

タバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのプラス鎖や、アボガドサンドウィッチウイルスのプラス鎖RNAやマイナス鎖RNAは、 Mg^{2+} の存在下で自己の触媒活性により切断されることが見出されている [Prody, G. A.ら、(1986) *Science* 231, 1577-1580 および Hutchins, C. J.ら、(1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 3627-3640参照]。これらのRNAの切断部位周辺のヌクレオチド配列は共通性を有しており、この共通性よりこれらRNAの二次構造が予想された。ウーレンベックは、これらの共通配列を基に19merの短鎖RNAフラグメントを設計し、該フラグメントが24merのRNAを触媒的に切断することを示した [Uhlenbeck, O. C. (1987) *Nature* 328, 596-600]。

【0003】

また、ウイルスやウイルスのサテライトRNAだけでなく、イモリのサテライトDNAの転写物もこのリボザイムのヌクレオチド配列を有することが報告されている [Epstein, L. M.及びGall, J. G. (1987) *Cell*, 48, 535-543]。このイモリのサテライトDNAの転写物の切断部位周辺のヌクレオチド配列を有する2種類の21mer RNAを化学合成し、この一方のRNAに他方を加えると、天然と同一の部位で切断反応が起こることが見出されている [Koizumi, M.ら、(1988) *FEBS Lett.* 228, 228-230]。さらに、この結果を基に、リボザイムを用いて他のRNAまたはポリリボヌクレオチド分子を切断する方法が開発されている [Koizumi, M.ら、(1989) *Nucleic Acids Res.* 17, 7059-7071]。

【0004】

一方、タバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖も切断反応を起こし、特定部位において切断を引き起こすことが明らかにされた [Buzayan, J. M.ら、(1986) *Nature* 323, 349-353]。また、この切断に必要なRNAの最小領域が明らかにされた [Hampel, A. および Tritz, R. (1989) *Biochemistry*, 28, 4929-4933]。この触媒活性を持つRNAは50ヌクレオチドからなり、このRNA内にヘアピンループ構造を有するモデルが提唱され、ヘアピン型リボザイムと名付けられた。このヘアピン型リボザイムのヌクレオチドを他のヌクレ

オチドに変換することによって、切断反応に重要ないくつかのヌクレオチドが明らかにされている [Chowrira, B. M.ら、(1991) *Nature* 354, 320-322 および Sekiguchi, A.ら、(1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 6833-6838]。また、パークらのグループは、ランダムな塩基配列をもつDNAとPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を用いたインビトロ選択（in vitro selection）法によってヘアピン型リボザイムの切断反応と連結反応に重要なヌクレオチド配列を明らかにしている [Berzal-Herranz, A.ら、(1992) *Gene & Development* 6, 129-134]。また、ヘアピンループ部分を欠失したRNAでも触媒反応が進行することも明らかにされている [Sekiguchi, A.ら、(1991) *Nucleic Acids Res.* 19, 6833-6838]。また、小泉らはヘアピン型リボザイムのヘアピンループを熱力学的に安定化した配列に変換することにより、リボザイムが従来型よりも高い活性を有するようになることを見出している [特開平6-181758号]。

【0005】

さらに、小松らは、プロパンジオール・ホスフェートを1回から13回繰り返したリンカーを介して、基質の5'末端の水酸基と、2本鎖からなるヘアピン型リボザイムのうちの短い鎖の3'末端の水酸基を結合したRNAを合成した。これらのRNAの切断活性を調べると、プロパンジオールホスフェートを7回以上繰り返して、基質とリボザイムの1本の鎖を結合したものに天然型を上回る活性があることを示した。このことは、ヘアピン型リボザイムの4つのヘリックスのうち、2番目のヘリックスと3番目ヘリックスとの間で折れ曲がった構造を有していることを示している [Komatsu, Y.ら、(1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116, 3602]。大塚らは、ここで示されたヘアピン型リボザイムの折れ曲がった高次構造を保持したままで、ヘアピン型リボザイムのドメインの結合位置を変換すること（触媒活性ドメインと基質結合ドメインを多量体のポリリボヌクレオチドを介してヘリックス1とヘリックス4の位置で結合したものを）を試みたところ、ドメインの結合位置を変換しても、ポリリボヌクレオチドがなお高いリボザイム活性を有していることを見出している [特開平8-131163号]。さらに小松らは、本来触媒活性ドメインと基質結合ドメインの2つからなるヘアピン型リボザイムにもう一つの切断ドメインを結合させた3つのドメインからなるリボザイムを構築

し、このリボザイムが、転写中に自己切断する自己トリミング活性を有していることを見出している [特開平 1 0 - 2 1 5 8 7 6 号]。

【 0 0 0 6 】

一方、リボザイムを細胞内で人工的に発現させることにより、疾患に関与する RNA を切断する試みがなされている [例えば Bratty, J. ら、(1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1216、345-359]。その場合、リボザイムをコードする DNA として投与したり、レトロウイルスベクターを用いる方法がとられる。いずれの方法においても、リボザイムの遺伝子を哺乳動物のプロモーターの支配下で発現させるシステムが用いられる。

【 0 0 0 7 】

更に本発明者等は、ハンマーヘッド型リボザイムに外部より添加したオリゴヌクレオチドが結合し、pseudo-half-knot 構造を形成することにより活性化することができることをすでに報告した [Komatsu ら、*J. Mol. Biol.*, 2000]。

【 0 0 0 8 】

【発明が解決しようとする課題】

上記背景から、本発明者等はハンマーヘッド型リボザイムとは別の型のリボザイムであるヘアピン型リボザイム (図 1) においても、オリゴ添加により活性化されるように変換することを目的として種々検討を行った。

【 0 0 0 9 】

天然のヘアピン型リボザイムは、図 1 に示すように 2 つのドメインよりなり、矢印の部位で RNA が切断される。ドメイン I はヘリックス 1、ヘリックス 2 および内部ループ A よりなり、ドメイン II は、ヘリックス 3、ヘリックス 4 および内部ループ B よりなる。4 つのヘリックスは塩基対の形成が重要であるが、他の塩基に変換可能である。一方 2 つの内部ループはほとんど切断活性に必要な塩基よりなる。特開平 6 - 1 8 1 7 5 8 号公報に記載の技術は、このヘアピン型リボザイムのヘリックス 4 にあたるヘアピンループを熱力学的に安定化したものであり、リボザイムの活性が外部より添加された核酸によって制御されるものではなく、常にリボザイムは活性化された状態にある。そのため、遺伝子検出に用いることはできないという問題がある。また、特開平 1 0 - 2 1 5 8 7 6 号公報に記載

の技術も同様に、ヘリックス 4 構造を形成しているため、活性制御が可能な形ではなく、常に活性化構造を形成している。

【 0 0 1 0 】

本発明の目的は、リボザイム単独では自己切断反応を起こさないが、目的のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドがリボザイムに結合することにより、リボザイムの構造が不活性型から活性型へ変化し、RNAを切断する活性を示すリボザイム、および該リボザイムを用いたポリリボヌクレオチドの切断方法を提供することを目的とする。

【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】

本発明は、オリゴヌクレオチドの存在下、初めて切断活性を示すポリリボヌクレオチド（以下「リボザイム」という。）および該ポリヌクレオチドを用いた基質ポリリボヌクレオチドの切断方法を提供するものである。

【 0 0 1 2 】

本発明者らは、ヘアピン型リボザイム単独では不活性であるが、外部より添加したオリゴヌクレオチドと結合することにより、リボザイムが活性化されるように、そのヘアピンループを変換し、リボザイムの活性制御がポリリボザイムヌクレオチドにより可能であることを見出し、本発明を完成した。図 2 にオリゴヌクレオチド結合前の不活性型構造とオリゴヌクレオチド結合後の活性化型構造の、リボザイム活性化の一例を示す。

【 0 0 1 3 】

すなわち本発明は、以下の（１）～（２１）を提供する。

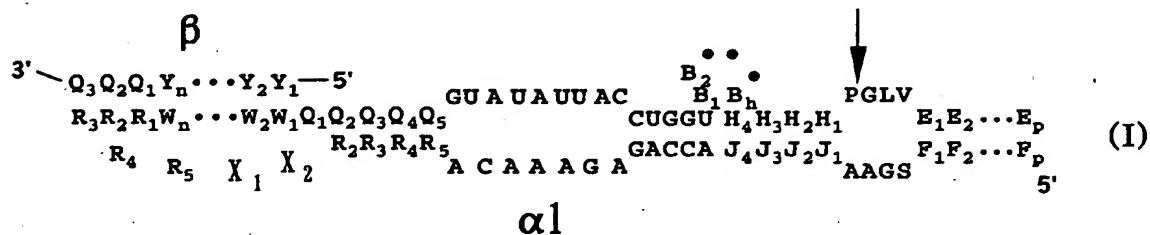
- （１） オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによるステムループ三次元構造の変化により活性化されることを特徴とするヘアピン型リボザイム。
- （２） オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション形成が 3 ～ 23 個の塩基対で構成される、上記（１）に記載のヘアピン型リボザイム。
- （３） オリゴヌクレオチドが標的塩基配列の一部であることを特徴とする、上記（１）または（２）に記載のヘアピン型リボザイム。
- （４） シス型リボザイムであり、活性化によって最初に自己切断することを特

徴とする、上記（１）から（３）のいずれかに記載のヘアピン型リボザイム。

（５） 一般式（Ⅰ）または（Ⅱ）にオリゴヌクレオチドとの複合体構造を示す、
上記（４）に記載のヘアピン型リボザイム。

【0014】

【化４】



【0015】

[式中、 $\alpha 1$ がリボザイム、 β がオリゴヌクレオチドの配列をそれぞれ示す。

Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、

B1～Bh、E1～Ep、H1～H4、Q1～Q5、W1～Wn、X1及びX2はそれぞれ同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、

F1～Fp、J1～J4、R1～R5、及びY1～Ynは、それぞれE1～Ep、H1～H4、Q1～Q5、及びW1～Wnに相補的なヌクレオチドを表し、

Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、

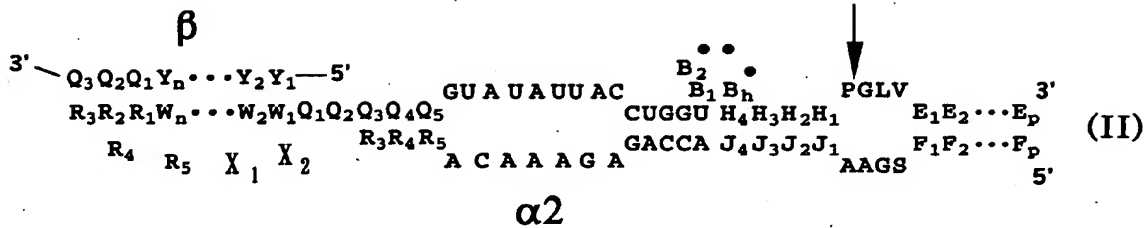
Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

hは3～20の整数、nは1～10の整数、pは1～10の整数をそれぞれ表す）。]

【0016】

【化5】



【0017】

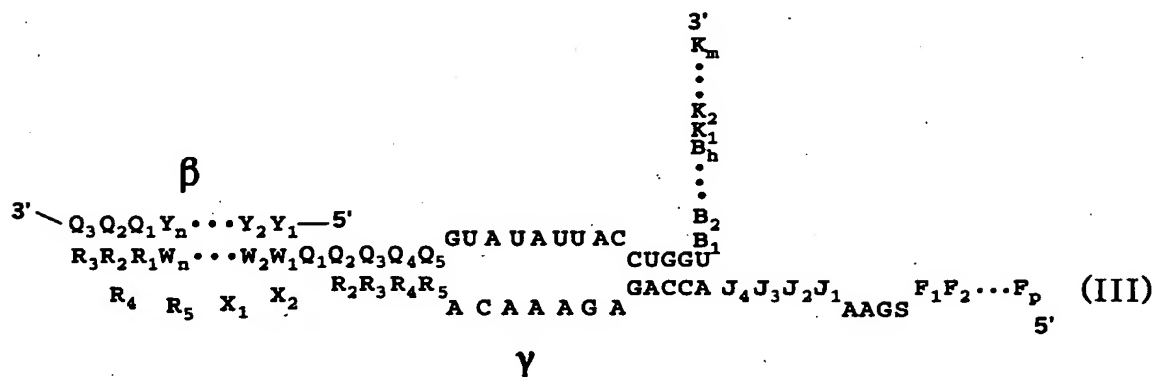
[式中、 $\alpha 2$ がリボザイム、 β がオリゴヌクレオチドの配列をそれぞれ示す。式中の記号は一般式(I)と同じ意味を示す。]

(6) トランス型リボザイムであり、活性化によって他のリボヌクレオチド配列を切断することを特徴とする、上記(1)または(2)に記載のヘアピン型リボザイム。

(7) 一般式(III)にオリゴヌクレオチドとの複合体構造を示す、請求項6に記載のヘアピン型リボザイム。

【0018】

【化6】



【0019】

[式中、 γ がリボザイム、 β がオリゴヌクレオチドの配列をそれぞれ示す。

Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、

B1~Bh、F1~Fp、J1~J4、K1~Km、Q1~Q5、W1~Wn、X1及びX

2はそれぞれ同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、

R1～R5、及びY1～Ynは、それぞれQ1～Q5、及びW1～Wnに相補的なヌクレオチドを表し、

Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

hは3～20の整数、mは1～10の整数、nは1～10の整数、pは1～10の整数をそれぞれ表す。]

【0020】

(8) 上記(1)から(7)のいずれかに記載のヘアピン型リボザイムを構成するリボヌクレオチドをコードするDNA。

(9) 上記(8)に記載のDNAを含有する組み換えベクター。

(10) 上記(9)に記載の組み換えベクターを導入した宿主細胞。

(11) オリゴヌクレオチドと不活性化型リボザイムのハイブリダイゼーションによってステムループ三次元構造を変化させることを特徴とする、ヘアピン型リボザイムの活性化方法。

(12) オリゴヌクレオチドの1または2以上のヌクレオチドが2'-O-メチル化されていることを特徴とする、上記(11)に記載のヘアピン型リボザイムの活性化方法。

【0021】

(13) 上記(1)から(7)のいずれかに記載のヘアピン型リボザイムによる標的塩基配列の検出方法。

(14) DNAチップ上に含まれるサンプルにおける標的塩基配列の存在を検出することを特徴とする、上記(13)に記載の検出方法。

(15) 上記(1)から(5)のいずれかに記載のヘアピン型リボザイムの自己切断によって切断された断片を検出することを特徴とする、標的塩基配列の検出方法。

(16) 蛍光色素、放射性標識によって切断断片を検出することを特徴とする、上記(13)から(15)のいずれかに記載の検出方法。

【0022】

(17) 上記(1)から(7)のいずれかに記載のヘアピン型リボザイムを含むことを特徴とする、サンプル中の標的塩基配列検出キット。

(18) 上記(1)から(7)のいずれかに記載のヘアピン型リボザイムを用いることを特徴とする、リボヌクレオチド配列の切断方法。

(19) 上記(1)から(7)のいずれかに記載のヘアピン型リボザイムとオリゴヌクレオチドを別に投与することを特徴とする、上記18に記載の切断方法。

(20) オリゴヌクレオチドの1または2以上のヌクレオチドが2'-O-メチル化されていることを特徴とする、上記17または18に記載の切断方法。

(21) 上記(1)から(7)のいずれかに記載のヘアピン型リボザイムを含む有する医薬組成物。

【0023】

本発明により、一般式(I)あるいは(II)における β 鎖の配列に応じて、一般式(I)あるいは(II)に示した配列に α 1鎖または α 2鎖を設計することにより、 β 鎖の配列特異的に自己切断反応を起こすリボザイムが設計可能となり、その切断断片または活性化されたリボザイムを調べることにより、 β 鎖の配列が検出されることになる。一般式(I)および(II)においては酵素部位と切断を受ける反応部位とが、同一鎖内に存在するが(シス反応)、切断を受ける部位が酵素と異なる鎖中に存在する一般式(III)においても β 鎖と γ 鎖とが複合体を形成することにより、 γ 鎖と結合しうるリボヌクレオチド鎖の配列特異的切断が誘導される(トランス反応)。このとき β 鎖と γ 鎖において形成される複合体は、過剰量存在するリボヌクレオチド鎖を酵素的に作用して切断することができる。そのため、病気の原因となる標的遺伝子のmRNAを切断するような一般式(III)の型の γ および β 鎖を設計することにより、標的mRNAを切断するリボザイムの活性誘導を β 鎖の添加によって行うことが可能となる。さらに β と γ 鎖の配列の組み合わせを変えることにより、複数の活性誘導型リボザイムを、それぞれに特異的な β 鎖の添加により活性調節することが可能となる。

【0024】

本発明においては、オリゴヌクレオチドと結合することにより、リボザイム本

体の 3' 末端に付近の配列で起こる切断反応を「自己切断」という。

本発明の遺伝子配列検出型リボザイムは、サンプル中等に目的のオリゴヌクレオチドが存在する場合自己切断を起こすが、この反応は試験管内において生ずるばかりでなく、細胞内において生成した目的のヌクレオチド配列を有するポリリボヌクレオチドと結合することにより、特異的に自己切断を起こす能力も有する。したがって、植物、動物または人体を問わず、目的の配列を有するポリリボヌクレオチドの検出を行うことが可能となる。

【 0 0 2 5 】

また、本発明は、RNAポリメラーゼ反応により上記「遺伝子配列検出型リボザイム」に転写されるヌクレオチド配列を含むDNA、該DNAを含む組換えベクターおよび該ベクターを保持する宿主細胞を提供するものである。該ベクターを細胞内に取り込ませることにより、該細胞は所望のポリリボヌクレオチドを特異的に切断する能力を有するようになる。対象とする細胞は、植物、動物または人体を問わない。

【 0 0 2 6 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について、更に詳細に説明する。

本発明は、オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによるステムループ三次元構造の変化により活性化されることを特徴とするヘアピン型リボザイムを提供する。本明細書においては、以下、特に示さない限り、「オリゴヌクレオチド」とは、本発明のヘアピン型リボザイムのステムループ三次元構造を変化させるオリゴヌクレオチドのことをいう。オリゴヌクレオチドは、より長い塩基配列の一部であっても良いが、好ましくは 5 ～ 1 5 個の鎖長のものが好適に使用できる。

【 0 0 2 7 】

リボザイムは、上記したように、図 1 に示すようなステムループ構造を有し、この三次元構造によりその活性が維持されていることが知られている。本発明において、「ステムループ三次元構造の変化」とは、単独（オリゴヌクレオチド不存在下）では分子内でハイブリダイズし、ステムを形成していたヌクレオチ

ド、及び／またはその近傍のヌクレオチドが、特定の配列のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることで、もはや分子内でハイブリダイズすることができなくなってループを形成し、それに伴ってオリゴヌクレオチドの不存在下における三次元構造とは異なる三次元構造をとるようになることをいう。この三次元構造の変化は、オリゴヌクレオチド不存在下の分子内ハイブリダイゼーション時における三次元構造と、オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーション時における三次元構造とにおいて、いずれがエネルギー的に安定であるかによって決定される。すなわち、ヘアピン型リボザイムのステムループ三次元構造を変化させるオリゴヌクレオチドは、リボザイムとのハイブリダイゼーションによって形成される複合体の方が、オリゴヌクレオチド不存在下における分子内ハイブリダイゼーションを形成した状態よりも安定な構造をとる程度にリボザイムと相補的であるものであれば良い。本発明のヘアピン型リボザイムの活性化のために好適なオリゴヌクレオチドとリボザイムとのハイブリダイゼーション形成は、リボザイムの切断活性に必要なドメインの配列に依存して変化するが、3～23個の塩基対の範囲であり、好ましくは5～15個、更に好ましくは7～12個の塩基対の範囲である。

【 0 0 2 8 】

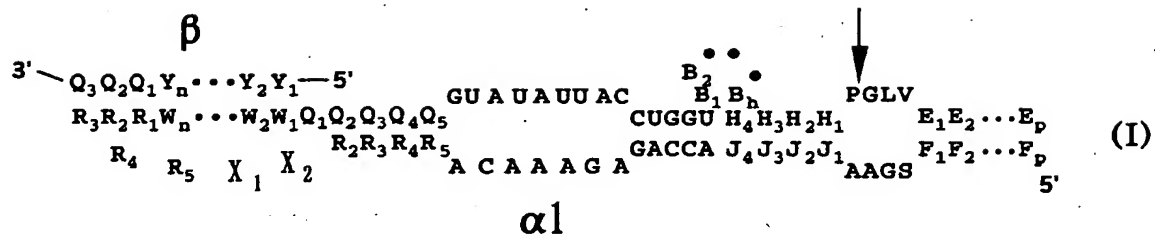
本発明の一態様において、オリゴヌクレオチドは、検出を目的とする標的塩基配列またはその一部である。この態様において、オリゴヌクレオチドはDNAまたはRNAのいずれであっても良く、1または2以上のヌクレオチドがメチル化等の修飾を受けているものであっても良い。この態様においては、サンプル中またはDNAチップ上等におけるオリゴヌクレオチドの存在の有無を、リボザイムの切断活性を指標として検出することができる。

【 0 0 2 9 】

この場合、リボザイムはシス型リボザイムであっても、トランス型リボザイムであっても良い。シス型リボザイムを使用する場合には、該リボザイムは、標的オリゴヌクレオチドの存在によって活性化され、最初に自己切断が生じる。このようなシス型リボザイムの好適な例としては、一般式(I)または(II)にオリゴヌクレオチドとの複合体構造を示す構造のものが挙げられる。

【0030】

【化7】



【0031】

[式中、α1 がリボザイム、β がオリゴヌクレオチドの配列をそれぞれ示す。

U はウラシルヌクレオチド、C はシトシンヌクレオチド、A はアデニンヌクレオチド、G はグアニンヌクレオチドを表し、

B1~Bh、E1~Ep、H1~H4、Q1~Q5、W1~Wn、X1 及び X2 はそれぞれ同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、

F1~Fp、J1~J4、R1~R5、及び Y1~Yn は、それぞれ E1~Ep、H1~H4、Q1~Q5、及び W1~Wn に相補的なヌクレオチドを表し、

S はアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

P はウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、

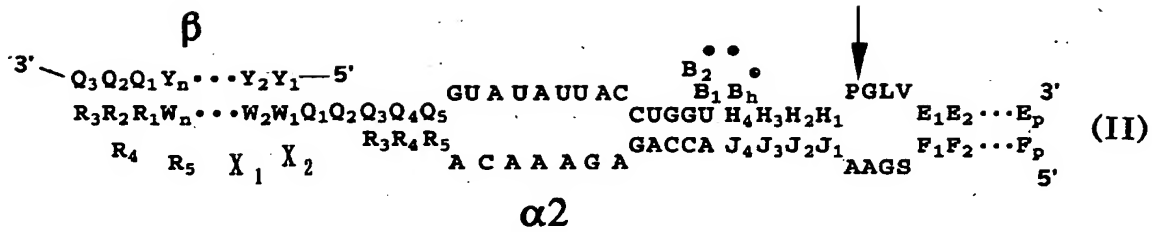
L はウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

V は、S がシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、S がアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

h は 3~20 の整数、n は 1~10 の整数、p は 1~10 の整数をそれぞれ表す)。]

【0032】

【化 8】



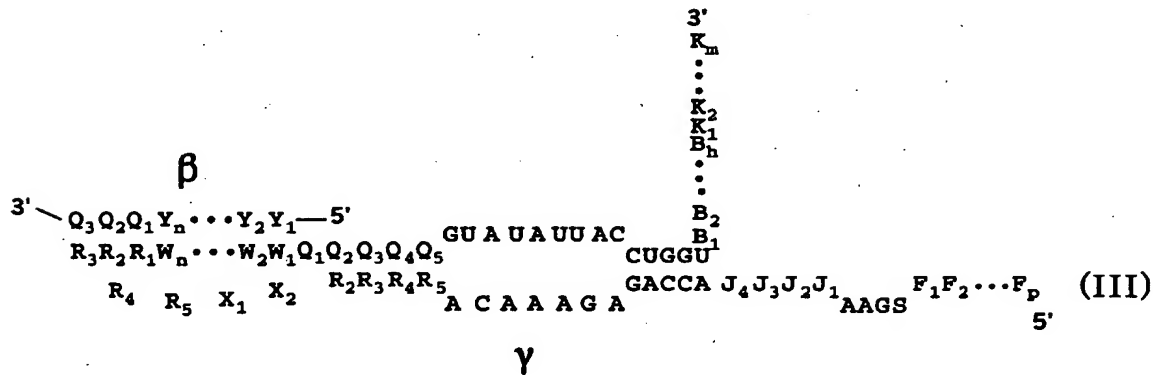
【0033】

〔式中、 $\alpha 2$ がリボザイム、 β がオリゴヌクレオチドの配列をそれぞれ示す。式中の記号は一般式(I)と同じ意味を示す。〕

一方、トランス型リボザイムを使用する場合には、該リボザイムは、標的オリゴヌクレオチドの存在によって活性化され、他のリボヌクレオチド配列を切断する。このようなトランス型リボザイムの好適な例としては、一般式(III) にオリゴヌクレオチドとの複合体構造を示す構造のものが挙げられる。

【0034】

【化 9】



【0035】

〔式中、 γ がリボザイム、 β がオリゴヌクレオチドの配列をそれぞれ示す。

Uはウラシルヌクレオチド、Cはシトシンヌクレオチド、Aはアデニンヌクレオチド、Gはグアニンヌクレオチドを表し、

B1~Bh、F1~Fp、J1~J4、K1~Km、Q1~Q5、W1~Wn、X1及びX2はそれぞれ同一または異なってウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、

R1～R5、及びY1～Ynは、それぞれQ1～Q5、及びW1～Wnに相補的なヌクレオチドを表し、

Sはアデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

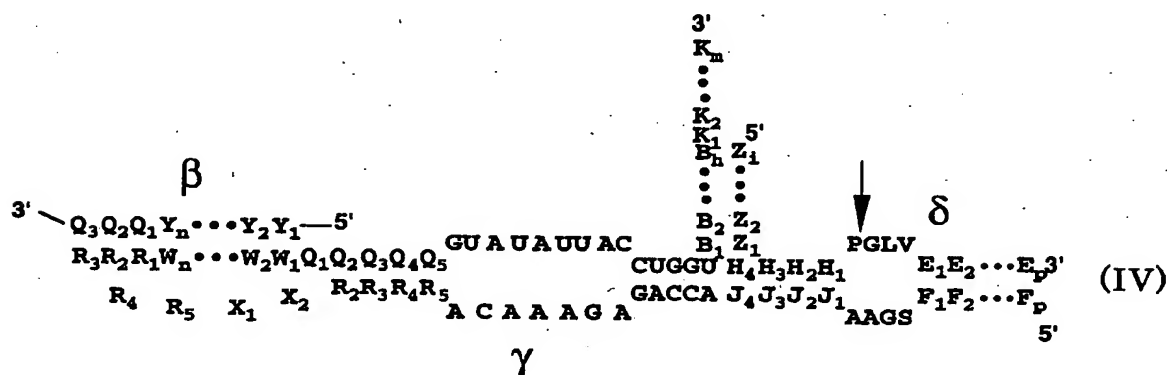
hは3～20の整数、mは1～10の整数、nは1～10の整数、pは1～10の整数をそれぞれ表す)。

【 0 0 3 6 】

この場合、切断されるリボヌクレオチドの配列はリボザイムの触媒ドメインの配列に依存し、下記一般式(IV)にオリゴヌクレオチド及びトランス型リボザイムとの複合体構造として示すような条件を満たす配列である。当業者であれば、リボザイムの配列に応じて切断される配列を決定することができ、また、所定のリボヌクレオチドに対してリボザイムの配列を適宜設計することもできる。

【 0 . 0 3 7 】

【化 1 0】



【 0 0 3 8 】

〔式中、 γ がリボザイム、 β がオリゴヌクレオチド、 δ が切断されるリボヌクレオチドの配列をそれぞれ示す。

Z1 ~ Zh ($h \leq i$)、E1 ~ Ep、及びH1 ~ H4は、それぞれB1 ~ Bh、F1 ~ Fp、及びJ1 ~ J4に相補的なヌクレオチドを表し、

Pはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチド、シトシンヌクレオチドまたはグアニンヌクレオチドのいずれかを表し、

Lはウラシルヌクレオチド、アデニンヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

Vは、Sがシトシンヌクレオチドの場合にはアデニンヌクレオチドを表し、Sがアデニンヌクレオチドの場合には、ウラシルヌクレオチドまたはシトシンヌクレオチドのいずれかを表し、

iはhまたはそれより大きい整数を表し、

式中のその他の記号は一般式(III)と同じ意味を示す。]

【0039】

上記一般式(I)、(II)及び(III)において、hは通常3～20、好ましくは3～12、さらに好ましくは3～8である。同じくnは通常1～10、好ましくは3～8、さらに好ましくは3～6である。同じくpは通常1～10、好ましくは3～10、さらに好ましくは4～9である。同じくmは通常1～30、好ましくは1～20、さらに好ましくは2～5である。

【0040】

一般式(I)及び(II)に示すシス型ヘアピン型リボザイムは、オリゴヌクレオチド存在下、矢印の部位で切断反応を起こす。一方、一般式(III)に示すトランス型ヘアピン型リボザイムは、オリゴヌクレオチド存在下で、別のリボポリヌクレオチドを切断する活性を示す。

【0041】

本発明はまた、上記のヘアピン型リボザイムを構成するリボヌクレオチドをコードするDNA、すなわち転写によって該リボヌクレオチドを得ることができる鋳型となるDNAを提供する。

本発明のヘアピン型リボザイムは、例えばin vitro selection法(試験管内進化法; 図5)により、以下のようにして構築することができる。

【0042】

まず、ヘアピン型リボザイムのヘアピンループ部分(図3bのN₂₀の部分)をランダムな塩基配列になるように鋳型DNAを構築し(ループ部位19～20塩基に相当する配列をランダムにするため、4²⁰種のリボザイムの鋳型DNAができる)、そこから転写反応によりリボザイムプールを得る。その後、リボザイム単独で切断活性を有する分子を除き(プレセレクションまたはネガティブセレクション)、残りのリボザイム単独では不活性な分子に目的のオリゴヌクレオチドを添

加して反応を行い、そこで切断反応を起こした分子を分離する（ポジティブセレクション；図5）。

【0043】

すなわち、得られたRNA分子は、リボザイム単独では活性ではないものの、オリゴヌクレオチド存在下において活性な分子である。しかしながら、実際には、一度の転写、ネガティブおよびポジティブセレクションでは真にアロステリックな分子を得ることは不可能なため、ポジティブセレクション後、再度逆転写反応によって鋳型DNAを得た後、そこから2回目の転写、ネガティブおよびポジティブセレクションを行い、さらにこれを繰り返すことで活性なりボザイムを濃縮することが好ましい。

【0044】

また、目的のリボザイム配列が予めわかっている場合、または上記試験管内進化法によって決定された場合は、合成によって得ることもできる。例えば、本発明のリボザイムに転写されるヌクレオチド配列を含むDNAを、両端の配列がオーバーラップするように、センスおよびアンチセンスの部分オリゴデオキシリボヌクレオチドを合成してから、DNAリガーゼによる連結反応や、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）[Saiki、R. K.ら、(1988) Science 239、487-491 参照]等のDNAポリメラーゼ反応を利用して、それら部分オリゴデオキシリボヌクレオチドを連結することにより作製することができる（図4）。

【0045】

オリゴデオキシリボヌクレオチドは、5'-水酸基をジメトキシトリチル基、塩基部のアミノ基をアシル基で保護した、ヌクレオシド3'-O-ホスホロアミダイト体（パーキンエルマー社、アマシャム-ファルマシア社、またはグレンリサーチ社より購入可能）を原料として、DNA/RNA自動合成機（例えば（株）パーキンエルマー・ジャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製）を用いることにより所望の配列のものを合成することができる[Koster、ら、(1984) Nucleic Acids Res. 12、4539 参照]。

【0046】

合成終了後、リン酸基の保護基のβ-シアノエチル基の除去、ポリヌクレオチ

ド鎖の担体からの切り出し、および塩基部のアシル基の除去をアルカリ処理により行い、次いで酸処理を行って5'-水酸基の保護基を除去する。これに続く逆相およびイオン交換クロマトグラフィー（高速液体クロマトグラフィーを含む）等の各種クロマトグラフィー等、通常の核酸精製に用いられる精製操作で精製することにより、DNA鎖を得ることができる。得られたDNAのヌクレオチド配列の確認は、例えばマキサム-ギルバートの化学修飾法 [Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) *Methods in Enzymology* 65, 499-559 参照] やM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法 [Messing, J. and Vieira, J. (1982) *Gene* 19, 269-276参照] により行うことができる。

【 0 0 4 7 】

かくして得られたオリゴデオキシリボヌクレオチドのセンス鎖とアンチセンス鎖とをアニーリングさせて二本鎖とし、DNAリガーゼを用いて細胞内で作用するプロモーターの支配下に該二本鎖DNAを連結することにより、本発明のリボザイムに転写されるDNAを構築することができる。

【 0 0 4 8 】

本発明のリボザイムは、例えばT7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列の下流に、上記のごとくして得られた本発明のリボザイムに転写されるDNAを連結したものに、ATP、CTP、GTPおよびUTPの存在下でT7 RNAポリメラーゼを作用させることにより得ることができる [Milligan, J. F.ら、(1987) *Nucleic Acids Res.* 15, 8783-8798 参照]。その他、T3 RNAポリメラーゼやSP6 RNAポリメラーゼ等、他の既知のRNAポリメラーゼおよびプロモーター配列の組み合わせを利用することもできる。

【 0 0 4 9 】

上記のようにして得られた本発明のリボザイムは、塩の形で使用することもできる。そのような塩としては、例えばナトリウム、カリウムのようなアルカリ金属；カルシウムのようなアルカリ土類金属；アンモニア；リジン、アルギニンのような塩基性アミノ酸；トリエチルアミンのようなアルキルアミン類；などの無機塩または有機塩を挙げることができる。

【 0 0 5 0 】

さらに、本発明は、上記本発明のリボザイムに転写されるヌクレオチド配列を含むDNAを含有する組み換えベクター及び該ベクターを導入した宿主細胞を提供する。該ベクターを宿主細胞へ導入することにより、本発明の宿主細胞を得ることができ、また、同時に本発明の発現ベクターを量産することもできる。

【0051】

宿主細胞およびベクターとしては以下のものが例示される。

原核細胞の宿主細胞としては、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*) や枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 等が挙げられる。目的の遺伝子をこれらの宿主細胞内で形質発現させるには、宿主細胞と適合し得る種由来のレプリコン、すなわち複製起点および調節配列を含んでいるプラスミドベクターで宿主細胞をトランスフェクトさせればよい。また、ベクターはトランスフェクトされた細胞に表現形質 (表現型) の選択性を付与することができる配列を持つものが好ましい。

【0052】

例えば、大腸菌としては、*E. coli* K12株等がよく用いられ、ベクターとしては一般にpBR322やpUC系のプラスミドがよく用いられるが、本発明ではこれらに限定されず、公知の各種の菌株およびベクターがいずれも利用できる。プロモーターとしては、大腸菌においてはトリプトファン (*trp*) プロモーター、ラクトース (*lac*) プロモーター、トリプトファン・ラクトース (*tac*) プロモーター、リボプロテイン (*lpp*) プロモーター、バクテリオファージ由来のラムダ (λ) PLプロモーター、ポリペプチド鎖伸長因子Tu (*tufB*) プロモーター等が挙げられ、いずれのプロモーターも本発明のリボザイムの産生に使用することができる。

【0053】

また、枯草菌としては、例えば、207-25株が好ましく、ベクターとしてはpTUB28 [Ohmura, K.ら、(1984) *J. Biochem.* 95, 87-93 参照] 等が用いられるが、本発明はこれらに限定されない。プロモーターとしては、枯草菌の α -アミラーゼ遺伝子の調節配列がよく用いられる。

【0054】

真核生物の宿主細胞としては、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が利用可能であ

り、脊椎動物細胞としては、例えば、マウスの細胞であるNIH-3T3細胞 [(1969) J. Virol. 4, 549-553参照]、サルの細胞であるCOS細胞 [Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182 参照] やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 [Urlaub, G. 及びChasin, L. A., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220 参照] 等がよく用いられているが、本発明は、これらに限定されない。脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNAのスプライシング部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これらはさらに必要に応じて複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40初期プロモーターを有するpSV2dhfr [Subramaniam, S.ら、(1981) Mol. Cell. Biol. 1, 854-864参照] やSV40初期プロモーターにHTLV-I LTRのR-U5連結したSR α プロモーターを有するpcDL-SR α [Takebe, Y.ら、(1988) Mol. Cell Biol. 8, 466-472 参照] 等を例示できるが、本発明はこれらに限定されない。また、真核微生物としては酵母も使用し得る。該酵母等の真核微生物の発現ベクターとしては、例えば、アルコール脱水素酵素遺伝子のプロモーター [Bennetzen, J. 及びHall, B. D., (1982) J. Biol. Chem. 257, 3018-3025参照] や酸性ホスファターゼ遺伝子のプロモーター [Miyanojima, A.ら、(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5参照] 等を使用できる。

【0055】

このようにして得られたベクターを導入することにより、他の原核生物または真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

【0056】

宿主細胞として大腸菌を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、pBR322複製起点を有し、大腸菌において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、翻訳開始シグナルを備えたものを用いることができる。該発現ベクターは塩化カルシウム法 [Mandel, M. 及びHiga, A. (1970) J. Mol. Bio

1. 53、154参照]、ハナハンの方法 [Hanahan、D. 及び Meselson、M. (1980) Gene 10、63 参照] および電気穿孔法 [Neumann、E.ら、(1982) EMBO J. 1、841-845 参照] 等により大腸菌に取り込ませることができ、かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

【0057】

また、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法 [Luthman、H. 及び Magnusson、G. (1983) Nucleic Acids Res. 11、1295-1308 参照]、リン酸カルシウム-DNA共沈殿法 [Graham、F. L. 及び van der Ed、A. J. (1973) Virology 52、456-457 参照] および電気穿孔法 [Neumann、E.ら、(1982) EMBO J. 1、841-845 参照] 等によりCOS細胞に取り込ませることができ、かくして所望のベクターがトランスフェクトされた細胞を得ることができる。

【0058】

また、宿主細胞としてCHO細胞を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するneo遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo [Sambrook、J.ら、(1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory、NY参照] やpSV2-neo [Southern、P. J. 及び Berg、P. (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1、327-341 参照] 等によって共形質転換し、G418耐性のコロニーを選択することにより本発明のリボザイムを安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。

【0059】

上記のごとくして得られた形質転換細胞は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内に本発明のリボザイムが産生される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものが適宜選択でき、例えば、大腸菌であればトリプトン-イースト培地（バクトトリプトン1.6%、イーストエキストラクト1.0%、NaCl 0.5% (pH7.0)）やペプトン培地（ディフコ社）等を使用できる。

【0060】

また、例えばCOS細胞であれば、RPMI-1640培地やダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）等の培地に、必要に応じウシ胎児血清（FBS）等の血清成分を添加したものを使用することができる。

本発明の別の態様は、オリゴヌクレオチドと不活性化型リボザイムとのハイブリダイゼーションによってステムループ三次元構造を変化させることを特徴とする、ヘアピン型リボザイムの活性化方法に関する。

【0061】

この態様においては、オリゴヌクレオチドは標的塩基配列として使用することもできるが、あるいは、リボザイムの活性調節剤として使用することもできる。すなわち、従来は活性の調節が困難であったリボザイムを、その配列特異的な特定のオリゴヌクレオチドの共存の有無によって活性化することができる。この場合、オリゴヌクレオチドはオリゴデオキシヌクレオチド及びオリゴリボヌクレオチドのいずれでも良いが、好ましくはオリゴリボヌクレオチドであり、その1または2以上のヌクレオチドが2'-O-メチル化されているとより好ましい。

【0062】

本発明のリボザイムが特定のオリゴヌクレオチドの存在下においてRNAを切断する活性を示すように変化することは、例えば以下に記載する実験によって確認することができる。

【0063】

一般式（I）の α 1および β で示される2種のポリリボヌクレオチド鎖からなる複合体は、まず、本発明のヘアピン型リボザイム α 1および検出を望むオリゴヌクレオチド β を、二価の金属イオンを含有する緩衝液中にて加温する。 α 1の切断断片を調べることにより、 β 鎖の存在が検出できることになる。このとき比較実験としてオリゴヌクレオチド β を添加しない系も平行して実験することにより、 α 1の切断が β の配列特異的に起こったかが明らかとなる。二価の金属イオンとしては、好適には Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Pb^{2+} 等が用いられる。緩衝液としては、中性からアルカリ性で使用される緩衝液であれば制限はないが、トリス-塩酸緩衝液、グリシル-グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液等が使用

され得る。

【0064】

反応温度は、0～100℃が好適であり、さらに30～50℃が好適である。

一定時間後、反応液中にエチレンジアミン四酢酸（以下「EDTA」という）を加えることにより反応を停止させる。

また、一般式（II）で示される α 2および β よりなる複合体を用いた切断反応も一般式（I）と同様に行われる。

【0065】

本発明はまた、上記本発明のヘアピン型リボザイムによる標的塩基配列の検出方法を提供する。標的塩基配列は、サンプル中に存在する状態のものであっても良く、またDNAチップ等のマイクロアレイ上に固定された状態のものであっても良い。この態様においては、特に限定するものではないが、リボザイムは自己切断し得るシス型リボザイムであることが好ましい。好適なリボザイムとしては、例えば一般式（I）または（II）に示す構造を有するものが挙げられる。この場合、リボザイムの自己切断は、リボザイムを鋳型DNAからの転写によって得る段階において、あらかじめ蛍光色素、放射性同位体等で標識し、外部より添加したオリゴヌクレオチドによって生成したリボザイムの切断産物を蛍光顕微鏡、イメージアナライザー等で定量する方法、切断産物を逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で定量する方法などを用いることができる。

【0066】

更に本発明は、検出すべき標的RNA（本発明のリボザイムを活性化可能なオリゴヌクレオチド）に応じた本発明のリボザイムを含むことを特徴とする、サンプル中の標的塩基配列検出用キットを提供する。この場合、検出すべき標的RNAの塩基配列に応じ、リボザイムの塩基配列を予め設計し、標的RNAに応じてリボザイムを使い分けることができる。本発明のキットにおいて、シス型リボザイムにおいてはリボザイム自身、トランス型リボザイムにおいてはリボザイムによって切断されるRNAをそれぞれ蛍光色素または放射性同位元素等によって標識したものをを用いることができる。これらキットに含まれるリボザイムをサンプルと混合し、リボザイムがサンプル中のRNAによって活性化され、自己切断を起こし、そ

れによって生じた蛍光色素の蛍光強度または波長の変化を検出することにより、目的RNAの存在を確認できる。

【 0 0 6 7 】

更に本発明は、DNAチップ、及び上記本発明のヘアピン型リボザイムを含むことを特徴とする、サンプル中の標的塩基配列検出用キットを提供する。DNAチップは、ゲノムプロジェクトの進行、バイオインフォマティクスの発展等に伴い、近年急速に利用されつつある核酸解析手段の一つである (Brown, P. O., Bots tein, D. Nat Genet. 1999, 21, 33-37)。本発明のキットにおいて、DNAチップ上には、種々のサンプルから調製された各種オリゴヌクレオチドを、当分野において公知の手段 (Ramsay, G., Nature Biotech. 16, 40-44) によって固定すればよいが、予めオリゴヌクレオチドを固定したDNAチップ (久原酵母cDNAチップ) を用いることができる。また、リボザイムとしては、シス型及びトランス型のいずれでも良く、自己切断または他のリボヌクレオチド配列の切断によって生じる切断断片を上記の検出方法によって検出可能なものとすれば良い。

【 0 0 6 8 】

また、本発明の更に別の態様は、上記本発明のヘアピン型リボザイムを用いることを特徴とする、リボヌクレオチド配列の切断方法である。この態様を用い、サンプル中の特定の配列を切断することができると共に、特定の遺伝子の発現または過剰発現による疾患、例えばエイズまたは癌等の予防または治療のための医薬としてヒトまたは動物に投与することができる。この場合、本発明のリボザイムは、活性調節剤となるオリゴヌクレオチドと共に同時に投与しても良く、またオリゴヌクレオチドと別個に投与しても良い。配列特異的にRNA等のポリリボヌクレオチドを切断するリボザイムを、その活性を調節し得るオリゴヌクレオチドと共に投与することで、切断を部位特異的にも制御することが可能である。この場合、活性を制御するためのオリゴヌクレオチドとしては、オリゴリボヌクレオチドであることが好ましく、その1または2以上のヌクレオチドが2'-O-メチル化されていると更に好ましい。

【 0 0 6 9 】

すなわち本発明はまた、上記本発明のヘアピン型リボザイムを含有する、ヒト

または動物のための医薬組成物を提供する。

本発明の医薬組成物は、本発明のリボザイムの他、製薬上使用できる担体、緩衝剤、保存剤等を含むものであっても良く、対象とする疾患に対する他の薬剤を含むしても良い。共存し得る薬剤はリボザイムの活性に影響しないものであれば特に限定されるものではない。本発明の医薬組成物の投与形態としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、または、注射剤、点滴剤、坐薬等による非経口投与を挙げることができる。

【 0 0 7 0 】

また、本発明のリボザイムに転写されるDNAを含む上記組み換えベクターを、リポソーム等の運搬体中に封入して投与することも可能である。そのようなリポソームとして、N-[1-(2, 3-ジオレイロキシ) プロピル]-N, N, N-トリメチルアンモニウム・クロリド (N-[1-(2, 3-dioleoyloxy)propyl]-N, N, N-trimethylammonium chloride ; DOTMA) とジオレオイルホスファチジル・エタノールアミン (dioleoylphosphatidyl ethanolamine ; DOPE) からなる「リポフェクチン (ギブコ・ビーアールエル社製)」やリポポリアミン [Behr, J. P.ら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6982-6986参照] 等が例示できるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 1 】

本発明の医薬組成物の投与量は、症状、年齢、体重等によって異なるが、通常、経口投与では、成人に対して、1日約0.1mgないし1000mgであり、これらを1回、または数回に分けて投与することができる。また、非経口投与では、1回0.1mgないし1000mgを皮下注射、筋肉注射、または静脈注射によって投与することができる。

【 0 0 7 2 】

また、本発明のDNAを好適な発現ベクターに組み込み、該ベクター自体を生体に投与することにより、細胞内でリボザイムを発現せしめ本発明の効果を得ることも可能である。そのようなベクターとして、レトロウイルス (Moloney murine leukemic virus [Eglitis, N. A. 及びAnderson, W. F. (1988) Biotechniques 6, 608-614参照] 等)、アデノウイルス [鐘ヶ江裕美ら、実験医学 (1994)

12、316-322]、アデノアソシエトウイルス [平井幸彦、島田隆、実験医学 (1994) 12、323-327] やワクシニアウイルス等が例示できるが、これらに限定されない。

【0073】

【実施例】

以下、実施例および参考例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

実施例 1

以下に示すインビトロセレクション法（試験管内進化法；図 5）により、オリゴヌクレオチドに応答するヘアピン型リボザイムを構築した（図 3）。

【0074】

まず、ヘアピン型リボザイムのヘアピンループをランダムな塩基配列になるように鋳型DNAを構築し（ループ部位 20 塩基に相当する配列をランダムにするため、 4^{20} 種のリボザイムの鋳型DNAができる）、そこから転写反応によりリボザイムプールを得た（図 4）。その後、リボザイム単独で切断活性を有する分子を除き（プレセレクションまたはネガティブセレクション）、残りのリボザイム単独では不活性な分子に目的のオリゴヌクレオチドを添加して反応を行い、そこで切断反応を起こした分子を分離した（ポジティブセレクション；図 5）。すなわち、得られたRNA分子は、リボザイム単独では活性ではないものの、オリゴヌクレオチド存在下において活性な分子である。しかしながら、実際には、一度の転写、ネガティブおよびポジティブセレクションでは真にアロステリックな分子を得ることは不可能なため、ポジティブセレクション後に再度逆転写反応によって鋳型DNAを得た後、そこから 2 回目の転写、ネガティブおよびポジティブセレクションを行い、さらにこれを繰り返すことで活性なりボザイムを濃縮した。

【0075】

その後何ラウンドか繰り返した後、十分にアロステリック効果を有するリボザイムが得られたところで、鋳型DNAをクローニングして配列を調べた。図 6 は、各ラウンドにおけるネガティブおよびポジティブセレクションの切断活性を示す。

【0076】

アロステリック効果の見られた34クローンの配列を調べたところ、18クローンが同じ配列(C1)であったが、残りは単一クローンであった(表1)。各クローンの活性を調べたところ、オリゴヌクレオチド非存在下においてはほとんど活性を示さず、オリゴヌクレオチド添加によって約200~300倍活性化されるクローンが幾つか見られた(表1)。18クローン見つかったリボザイム配列(C1)も高い活性化を有しており、また、C1ヘアピンループのうち一塩基のみが欠失したリボザイム(C4)は、C1よりも若干高い活性を示した。各クローンのオリゴヌクレオチド結合時のヘアピンループの予想構造を図7に示す。

【0077】

【表1】

クローン	クローン数	m7G (-)	m7G (+)		$k_{\text{obs}(+)}/k_{\text{obs}(-)}$
		$k_{\text{obs}(-)}$ (min ⁻¹)	$k_{\text{obs}(+)}$ (min ⁻¹)	End point (%)	
C1	18	0.0033	0.69	63	207
C2	1	0.0019	0.66	67	345
C4	1	0.0023	0.74	67	327
C6	1	0.0039	0.20	61	51
C11	1	0.035	0.28	64	7.9
C14	1	0.0031	0.25	68	80
C21	1	0.0022	0.12	65	53
C23	1	0.0026	0.34	69	133
C25	1	0.0018	0.15	63	87
C27	1	0.0021	0.25	62	120
C28	1	0.0022	0.56	69	257
C29	1	0.0030	0.14	58	46
C32	1	0.0026	0.55	69	208
C33	1	0.0038	0.55	73	143
C36	1	0.0024	0.54	69	223
C39	1	0.0028	0.53	71	190
C40	1	0.0018	0.054	46	30
計	34				

【0078】

このインビトロセレクションにおいて用いたオリゴヌクレオチドは2'-O-メチルオリゴヌクレオチド (m7G 2'-OMe(GAGUGAG)rG; 3'末端のGのみリボヌクレオチド)である。しかしながら、C1については全てがメチル化されていないオリ

ゴリボヌクレオチド (r7G) でも十分に高い活性を示した。

【0079】

上記の結果より、オリゴヌクレオチド非存在下においては、ヘアピン型リボザイムの活性に必要な内部ループB (図3) が、活性な構造を形成不可能な構造となっているが、オリゴヌクレオチドがヘアピンループに結合することにより、内部ループBの構造が活性型へと変換するため活性化されるというシステムが明らかとなった。つまり、図8のような構造変化を起こす配列は、ヘアピン型リボザイムの活性化のみではなく、オリゴの配列を酵素部位に伝達するモジュールとして興味深いものであると考えられる。

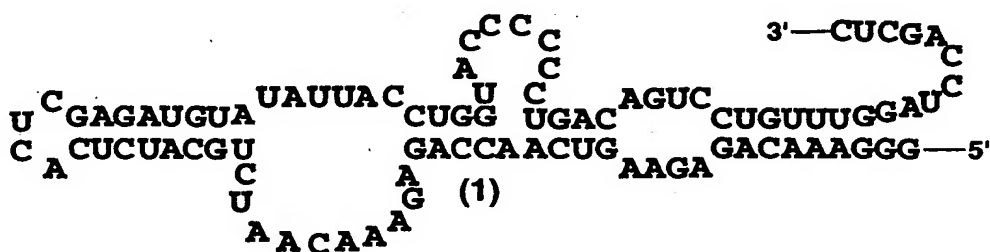
【0080】

実施例2 オリゴデオキシリボヌクレオチドの合成

オリゴリボヌクレオチドにより切断活性が誘導される下記の構造を有するポリリボヌクレオチド (1) (配列番号2) およびポリリボヌクレオチド (2) (配列番号4) を転写によって得るために用いる鋳型DNA1 (配列番号1) および鋳型DNA2 (配列番号3) を合成した。

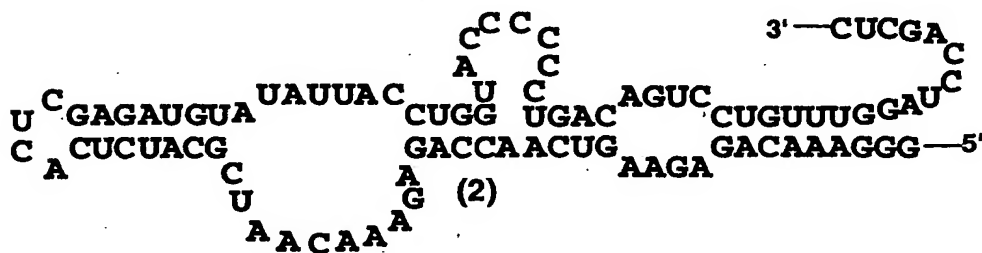
【0081】

【化11】



【0082】

【化12】



【0083】

まず、以下に記載するオリゴデオキシリボヌクレオチド：5'-CGGCGAATTCTAATA
CGACTCACTATAGGGAAACAGAGAAGTCAACCAGAGAA (U1；配列番号5)
GAGCTGGATCCAAACAGGACTGTCAGGGGGGTACCAGGTAATATACATCTCGAGTGAGATGCAGATTGTTTC
TCTGGTTGACTTCTCTG (L1；配列番号6)；
GAGCTGGATCCAAACAGGACTGTCAGGGGGGTACCAGGTAATATACATCTCGAGTGAGATGC GATTGTTTC
TCTGGTTGACTTCTCTG (L2；配列番号7) を合成した。U1とL1より鋳型DNA1を、U
1とL2より鋳型DNA2を調製した。

【0084】

上記の各オリゴデオキシリボヌクレオチドは、デオキシヌクレオシド3'-ホ
スホロアミダイト ((株) パーキンエルマージャパン・アプライドバイオシステ
ムズ事業部より購入) を原料として、DNA自動合成機 (モデル394A；(株)
パーキンエルマージャパン・アプライドバイオシステムズ事業部製) で、1 μ m
o1スケールで合成した。

【0085】

合成終了後、U1は以下のように処理し精製した。濃アンモニア水でCPG (Controlled Pore Glass) よりオリゴデオキシリボヌクレオチドを切り出し、60℃で5時間加温した。溶媒を留去し、脱イオン水に溶解した後、C18シリカゲル (ウォーターズ社製) カラムクロマトグラフィーを行なった (カラムサイズ1.5 x 12 cm：5-40% アセトニトリル、0.1M トリエチルアンモニウムアセテート (Triethylammoniumacetate；以下「TEAA」という) 水溶液の溶媒を用いた直線濃度勾配により溶出)。約30%濃度のアセトニトリルで溶出されるジメトキシトリチルの発色を有するフラクションを集め、2mlの80%酢酸水溶液を加え、1時間攪拌した。酢酸を減圧下留去し、水層を酢酸エチルで洗浄した。溶媒を留去後、滅菌水1mlに溶解した。この画分中のポリリボヌクレオチドを逆相HPLCで分取後、さらにイオン交換HPLCで分取し、精製した。逆相HPLCの条件は以下の通りであった：カラム： μ -ボンダスフィアー (C-18) カラム Φ 3.9 x 150 mm (ウォーターズ社製)
溶媒：A溶液 5% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)；

B溶液 25% アセトニトリル/0.1M TEAA (pH7.0)。

U1の逆相HPLCにおける直線濃度勾配の条件および保持時間を表2に示す。

【0086】

【表2】

	B %	直線濃度勾配の全時間	保持時間
U1	20→40%	20 分	16.2 分

【0087】

L1およびL2はU1と同様にDNA自動合成機により合成後、8%変性ポリアクリルアミドゲルにより泳動し、254nmの紫外線をゲルに照射し、目的のL1が含まれるゲル片を切り取った。ゲル片を滅菌水800 μ l中に浸し、核酸をゲル片より抽出後、NAP10（アマシャムファルマシアバイオテク社）により脱塩精製し、L1およびL2を得た。

【0088】

実施例3 鋳型DNAの調製

鋳型DNA 1は、次のように構築した。構築の概略図を図9に示す。

L1 DNA (200 pmol) およびU1 primer (240 pmol) にT7 sequenase 反応用緩衝液 (×5、200 mM Tris-HCl (pH 7.5)、100 mM MgCl₂、250 mM NaCl) 20 μ lおよび滅菌水を加え、全量を93 μ lとし、90℃で5分間変性させた後、室温になるまで徐冷した。これに0.1 M ジチオスレイトール (以下「DTT」という) 5 μ l、25 mM dATP、25 mM dCTP、25 mM dGTPおよび25 mM dTTP 各1.5 μ l、T7 sequenase DNA ポリメラーゼ 0.5 μ l (6.5 U、アマシャムファルマシアバイオテク社)を加え、37℃で2時間伸長反応を行った。この反応液をフェノール処理、フェノール・クロロホルム処理を行なった後、エタノール沈殿を行い、回収した鋳型DNAはTE緩衝液20 μ lに溶解した。得られたtemplate DNAは、10% 未変性ポリアクリルアミドゲル (29:1) によって分離精製し、回収したtemplate DNAは10 mM トリス 塩酸緩衝液 (pH8.0) 30 μ lに溶解した。

鋳型DNA 2も鋳型DNA1と同様に調製した。

【 0 0 8 9 】

実施例 4 鋳型 DNA 1 からのポリリボヌクレオチド (1) の転写反応

実施例 3 で調製した template DNA 1 を用いて以下に示した転写反応によって目的のポリリボヌクレオチド (1) を得た。転写反応は AmpliScribeTM T7 転写キット (エアブラウン社) を用いて行った。鋳型 DNA 1 または 2、20 ng、T7 転写反应用緩衝液 (キット付属) ($\times 10$) 1 μ l、25 mM ATP、25 mM CTP、25 mM GTP および 25 mM UTP 各 3 μ l、 $[\alpha - ^{32}\text{P}]$ UTP 0.5 μ l、100 mM DTT 1 μ l、AmpliScribeTM T7 酵素溶液 (キット付属) 1 μ l を混合し、滅菌水を加え全量を 10 μ l とし、37°C で 2 時間反応した。これに RNase-free DNase I 0.5 μ l (1 molecular biology unit) を加え 37°C で 15 分間処理し、NAP5 (アマシャムファルマシアバイオテック社) によって粗精製した。フェノール・クロロホルム処理、クロロホルム処理し、エタノール沈殿を行い、回収した RNA は滅菌水 20 μ l に溶解した。

【 0 0 9 0 】

鋳型 DNA 2 から鋳型 DNA 1 と同様に転写反応を行い、ポリリボヌクレオチド (2) を得た。

ポリリボヌクレオチド (1) は、本発明の請求項一般式 I の $\alpha 1$ に、またポリリボヌクレオチド (2) は、本発明の請求項一般式 I I の $\alpha 2$ に相当するポリリボヌクレオチドである。

【 0 0 9 1 】

参考例 1 リボザイムの活性を誘導するオリゴリボヌクレオチドの合成

ポリリボヌクレオチド (1) および (2) のヘアピンループに結合するオリゴリボヌクレオチド (3) (GAGUGAGG) および、オリゴリボヌクレオチド (3) の配列のうち 2 塩基をポリリボヌクレオチド (1) と相補的ではない配列に変化させたオリゴリボヌクレオチド (4) (GAGUGUCG) を以下のように合成、分取、精製した。オリゴリボヌクレオチド (4) は、オリゴリボヌクレオチド (3) によるポリリボヌクレオチド (1) および (2) の特異的活性化を確認するために、塩基対形成の少ないものとして合成した。

【 0 0 9 2 】

リボヌクレオシド 3' -ホスホロアミダイト (GLENリサーチ) を用いて、DNA 自動合成機 (Applied Biosystem Model 3 9 4 A) でオリゴリボヌクレオチド (3) および (4) を合成した。RNA 断片は、1 μ mol スケールで合成した。合成終了後、合成したオリゴヌクレオチドが結合したCPG (Controlled Pore Glass) を濃アンモニア水：エタノール (3 : 1 v/v) 混液で室温 2 時間処理をし、更に 5 5 $^{\circ}$ C で 1 6 時間加温した。溶媒を留去し、残渣に 1 ml の 1 M TBAF (Tetrabutylammonium fluoride) / THF (Tetrahydrofuran) 溶液を加え、3 7 $^{\circ}$ C で 1 6 時間攪拌した。これに 5 ml の 0.1 M triethylammonium acetate (pH 7.0) を加えた後、C 1 8 シリカゲル (ウォーターズ社製) カラムクロマトグラフィーを行なった (カラムサイズ 1.5 \times 1 2 cm : 5 - 4 0 % アセトニトリル、5 0 mM Triethylammonium bicarbonate 水溶液の溶媒を用いた濃度勾配により溶出)。約 3 0 % 濃度のアセトニトリルで溶出されるジメトキシトリチルの発色を有するフラクションを集め、5 ml の 0.0 1 N HCl を加え、1 時間攪拌した。0.1 N アンモニア水で中和後、水層を酢酸エチルで洗浄し、溶媒留去後滅菌水 1 ml に溶解した。この画分中のポリリボヌクレオチドを逆相 HPLC で分取後、さらにイオン交換 HPLC で分取し、精製した。これらオリゴヌクレオチドはリボザイムの切断反応に用いるため後述の実験に供した。オリゴヌクレオチド (4) は、逆相 HPLC における精製は行わず、イオン交換 HPLC においてのみの精製を行い、高純度に精製した。

【 0 0 9 3 】

逆相およびイオン交換 HPLC の条件は以下の通りであった：

逆相 HPLC

カラム： μ -ボンドスフィアー (C-1 8) カラム、 Φ 3.9 \times 3 0 0 mm (ウォーターズ社製)

溶媒：A 溶液 5 % アセトニトリル / 0.1 M TEAA (pH 7.0) ；

B 溶液 2 5 % アセトニトリル / 0.1 M TEAA (pH 7.0) 。

【 0 0 9 4 】

イオン交換 HPLC

カラム：TSKgel DEAE 2 SW カラム、4.6 \times 2 5 0 mm、東ソー (株) 製

溶媒：A 溶液 2 0 % アセトニトリル；

B 溶液 2 0 % アセトニトリルを含む 2 M HCOONH_4

オリゴリボヌクレオチド (3) および (4) の逆相およびイオン交換 H P L C における直線濃度勾配の条件および保持時間を表 3 に示す。

【0 0 9 5】

【表 3】

逆相 HPLC

	B %	直線濃度勾配の全時間	保持時間
オリゴヌクレオチド (3)	0 → 2 0 %	2 0 分	1 9 分

イオン交換 HPLC

	B %	直線濃度勾配の全時間	保持時間
オリゴヌクレオチド (3)	1 5 → 3 5 %	2 0 分	1 7 分
オリゴヌクレオチド (4)	1 5 → 3 5 %	2 0 分	1 6 分

【0 0 9 6】

参考例 2 2'-0-メチルオリゴヌクレオチド (5) (GAGUGAGG) の合成および精製

オリゴヌクレオチド (3) と同じ配列を有する 2'-0-メチルオリゴリボヌクレオチド (5) は、上記参考例 1 における合成に用いたリボヌクレオシド 3' ホスホロアミダイト (グレンリサーチ社) の代りに、2'-0-メチルリボヌクレオシド 3' ホスホロアミダイト (グレンリサーチ社) を用い、DNA 自動合成機 (Applied Biosystem Model 3 9 4 A) で参考例 1 と同様に合成および精製した。ただし、2'-0-メチルオリゴリボヌクレオチド (5) の 3' 末端は通常のリボヌクレオシドとなるようにリボヌクレオシド樹脂を用いて合成した。すなはち合成された 2'-0-メチルオリゴリボヌクレオチド (5) は 5' [2'-OMe(GAGUGAG)rG] 3' である。逆相およびイオン交換 HPLC に用いたカラムおよび溶媒は、参考例 1 と同様のものを用いた。オリゴリボヌクレオチド (5) の逆相およびイオン交換 H P L C における直線濃度勾配の条件および保持時間を表 4 に示す。

【0 0 9 7】

【表 4】

逆相 HPLC

	B %	直線濃度勾配の全時間	保持時間
オリゴヌクレオチド (5)	15 → 35%	20 分	12.7 分

イオン交換 HPLC

	B %	直線濃度勾配の全時間	保持時間
オリゴヌクレオチド (5)	15 → 35%	20 分	17.5 分

【0098】

実施例 5 オリゴヌクレオチド非存在下および存在下におけるポリリボヌクレオチド (1) の切断反応

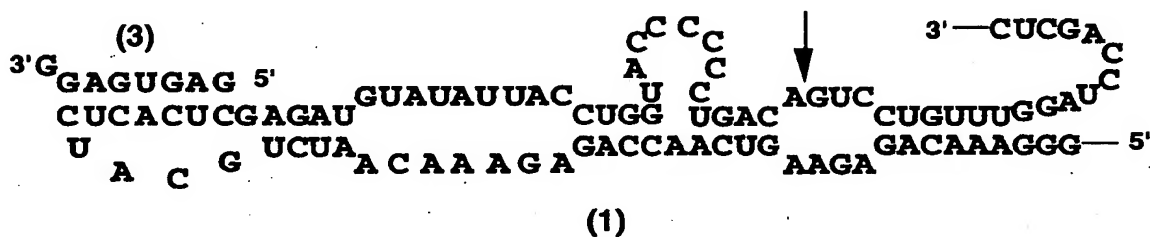
実施例 4 において得られたポリリボヌクレオチド (1) (16 pmol) を切断反応用緩衝液 (×1、40 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、12 mM 塩化マグネシウム、2 mM スペルミジン三塩酸塩) 8 μ l に溶解し、また別にオリゴヌクレオチド (3)、(4) または (5) (200 pmol) を切断反応用緩衝液 10 μ l に溶解した。90℃で2分間変性後氷冷したポリリボヌクレオチド (1) に、別に加熱変性したオリゴヌクレオチド (3)、(4) または (5) 8 μ l を加え、37℃で反応を開始した。一定時間毎にサンプリングし、50 mM EDTA と 10 M 尿素を含む溶液 (5 μ l) に加え反応を停止させた。得られた反応混合物を、8M 尿素を含む 20% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することにより、反応生成物と未反応物を分離した。電気泳動後のゲルを、バイオイメージアナライザー (BAS 2000; 富士写真フイルム (株) 社製) を用いて分析した。すなわち、反応生成物と未反応物のアイソトープ活性を定量し、切断率を求め、見かけの反応速度定数 k_{obs} を算出した。また、オリゴヌクレオチド非存在下におけるポリリボヌクレオチド (1) の反応は、上記オリゴリボヌクレオチド (3)、(4) または (5) を添加せずに上記反応において用いた切断反応用緩衝液 (×1) 8 μ l のみをポリリボヌクレオチド (1) に添加して行い、一定時間毎にサンプリングしその切断率から速度定数を求めた。

【0099】

ポリリボヌクレオチド (1) とオリゴヌクレオチド (3) とで形成する複合体 RNA は、本発明の活性化された遺伝子配列検出型リボザイムであり、ポリリボヌクレオチド (1) 単独では切断反応を起こさないが、オリゴヌクレオチド (3) と結合することにより矢印の部位で RNA の切断反応が起こった。

【0100】

【化 13】

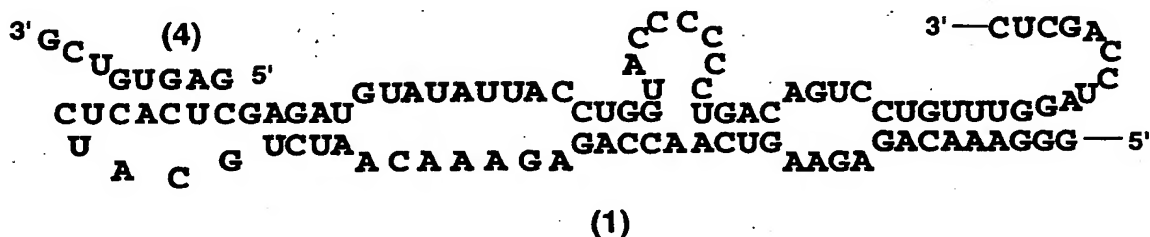


【0101】

また、ポリリボヌクレオチド (1) およびオリゴリボヌクレオチド (4) とで形成される複合体 RNA は、2つの RNA 間で形成される水素結合が比較的弱く、不安定であり、ポリリボヌクレオチド (1) の切断反応はほとんど起こらなかった。これは、オリゴリボヌクレオチド (4) はポリリボヌクレオチド (1) と完全には相補的ではなく、オリゴリボヌクレオチド (4) の 5' 末端側の 5 塩基のみが、ポリリボヌクレオチド (1) と相補的なことに由来する。

【0102】

【化 14】



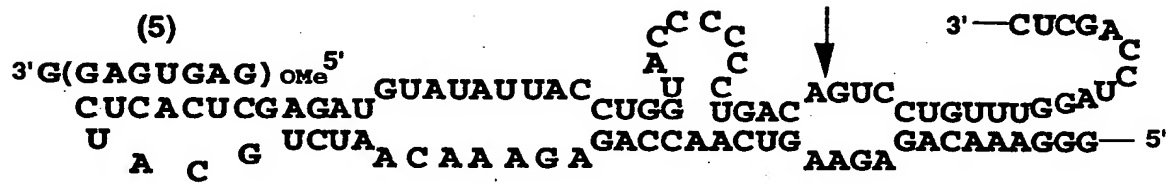
【0103】

ポリリボヌクレオチド (1) およびオリゴリボヌクレオチド (5) で形成する複合体 RNA は、本発明の構造をみたす複合体であるが、請求項一般式 I の β に相

当するRNAの5'側7残基が、2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチドである。2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド・RNA 2本鎖は、RNA・RNA 2本鎖よりも安定な2本鎖を形成することが知られている。そこで、2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチドのポリリボヌクレオチド(1)に対する切断活性誘導を調べた。

【0104】

【化15】



【0105】

ポリリボザイムヌクレオチド(1)は、オリゴヌクレオチド(3)が存在しない条件およびポリリボヌクレオチド(1)と安定に結合できないオリゴヌクレオチド(4)存在下では、ほとんど自己切断反応を示さなかったのに対し、ポリリボヌクレオチド(1)と相補的なオリゴヌクレオチド(3)存在下では、ポリリボヌクレオチド(1)は特異的に自己切断反応を起こした。このことは、ポリリボヌクレオチド(1)と結合しうるオリゴヌクレオチド存在下において、特異的にポリリボヌクレオチド(1)の切断反応が起こったことを示しており、配列の検出が可能であることを示唆している。また、ポリリボヌクレオチド(1)は、オリゴヌクレオチド(5)の添加によっても高い切断活性を示したため、ポリリボヌクレオチド(1)の活性を誘導するオリゴヌクレオチドは、RNA鎖ばかりではなく、リボザイムと安定に結合しうる2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチドでも可能なことが示された。図10には例として、ポリリボヌクレオチド(1)の、オリゴヌクレオチド(5)無添加(マイナスレーン)および添加(プラスレーン)における0分、1分、3分、5分、7分、10分、12分の切断反応の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す。ポリリボヌクレオチド(1)は、単独では切断断片を与えないが、オリゴヌクレオチド(5)の添加により特異的に切断反応を起こしている。

【0106】

各オリゴヌクレオチド存在下におけるポリリボヌクレオチド (1) の切断速度定数 (k) を表5に示す。ポリリボヌクレオチド (1) の切断活性を最も効率よく誘導したのは2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド (5) であった。これは、2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチドの方がオリゴヌクレオチドよりも安定にRNAと結合可能であることに由来すると思われる。

【0107】

【表5】

	k
ポリリボヌクレオチド (1)	0.0033 min ⁻¹
ポリリボヌクレオチド (1) + オリゴヌクレオチド (3)	0.61 min ⁻¹
ポリリボヌクレオチド (1) + オリゴヌクレオチド (4)	0.0022 min ⁻¹
ポリリボヌクレオチド (1) + オリゴヌクレオチド (5)	0.69 min ⁻¹

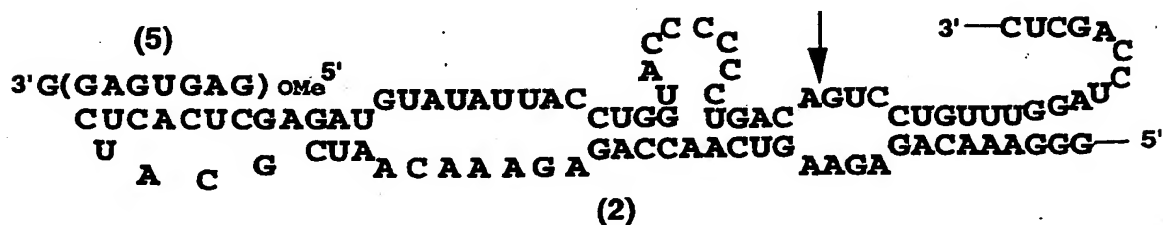
(N.D. ; not detected)

【0108】

実施例6 オリゴヌクレオチド非存在下および存在下におけるポリリボヌクレオチド (2) の切断反応

【0109】

【化16】



【0110】

実施例5の切断反応と同様に、実施例4において得られたポリリボヌクレオチド (2) を用いてオリゴヌクレオチド添加による切断活性を調べた。オリゴヌクレオチドとして、実施例5において最も高い誘導活性を示した2'-O-メチルオリ

ゴリボヌクレオチド (5) を用いた。ポリリボヌクレオチド (2) (16 pmol) を切断反応用緩衝液 (×1、40 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、12 mM 塩化マグネシウム、2 mM スペルミジン三塩酸塩) 8 μ l に溶解し、また別にオリゴヌクレオチド (5) (200 pmol) を切断反応用緩衝液 10 μ l に溶解した。90°C で2分間変性後氷冷したポリリボヌクレオチド (1) に、別に加熱変性したオリゴヌクレオチド (5) 8 μ l を加え、37°C で反応を開始した。一定時間毎にサンプリングし、50 mM EDTA と 10 M 尿素を含む溶液 (5 μ l) に加え反応を停止させた。得られた反応混合物を、8M 尿素を含む 20% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することにより、反応生成物と未反応物を分離した。電気泳動後のゲルを、バイオイメージアナライザー (BAS 2000; 富士写真フイルム (株) 社製) を用いて分析した。すなわち、反応生成物と未反応物のアイソトープ活性を定量し、切断率を求め、見かけの反応速度定数 k_{obs} を算出した (表 6)。また、オリゴヌクレオチド非存在下におけるポリリボヌクレオチド (2) の反応は、上記オリゴリボヌクレオチド (5) を添加せずに上記反応において用いた切断反応用緩衝液 (×1) 8 μ l のみをポリリボヌクレオチド (2) に添加して行い、一定時間毎にサンプリングしその切断率から速度定数を求めた。

【0 1 1 1】

ポリリボヌクレオチド (2) は、それ単独ではほとんど切断反応を起こさないが、オリゴヌクレオチド (5) 共存下において矢印の部位で RNA の切断反応が起こった。

【0 1 1 2】

【表 6】

	k
ポリリボヌクレオチド (2)	0.0023 min ⁻¹
ポリリボヌクレオチド (2) + オリゴヌクレオチド (5)	0.74 min ⁻¹

(N.D.; not detected)

【0 1 1 3】

実施例 7

実施例 5 および 6 においては、鋳型 DNA より転写したリボザイムを単離後、オリゴヌクレオチド添加により切断反応を調べた。しかしながら、その反応では得られる切断生成物の量は、反応開始時に供される RNA 量に限定される。また、RNA は不安定であるため検出試薬として用いる場合、その保存等において困難な場合がある。そこで、検出感度を上げ、さらに転写後に RNA を単離せずにリボザイムの切断反応が起こるかどうかを調べるため、鋳型 DNA からの転写中の切断反応を調べる実験を行った。鋳型 DNA より次々に転写されるリボザイムが、共存するオリゴヌクレオチドと結合後切断反応が起こることにより、より多くの切断生成物が得られ、より高い感度が期待できる。鋳型 DNA 1 または鋳型 DNA2 (50 nmol とオリゴリボヌクレオチド (5) (600 pmol) に切断反应用緩衝液 ($\times 5$, 200 mM トリス-塩酸 (pH 7.5)、60 mM 塩化マグネシウム、10 mM スペルミジン三塩酸塩) 4 μ l、2.5 mM NTPs (ATP、GTP、CTP、UTP) 4 μ l、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ UTP 1 μ l、100 mM DTT 1 μ l、適当量の滅菌水を加え溶解し、Ampliscribe T7 RNA ポリメラーゼ 2 μ l を加えて全量を 20 μ l とし、37°C で反応を開始した。適当な時間に 50 mM EDTA と 10 M 尿素を含む溶液 (5 μ l) に反応液 1.5 μ l 加え反応を停止させた。得られた反応混合物を、8M 尿素を含む 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することにより、反応生成物と未反応物を分離した。電気泳動後のゲルを、バイオイメージアナライザー (BAS 2000; 富士写真フイルム (株) 社製) を用いて分析した。オリゴリボヌクレオチド (5) 存在下における転写反応において特異的にポリリボヌクレオチド (1) の切断反応が起こっているゲル電気泳動の結果を図 11 に示す。すなわち、反応生成物と未反応物のアイソトープ活性を定量し、切断率を求め、見かけの反応速度定数 k_{obs} を算出した。

【0114】

オリゴリボヌクレオチド (5) 非存在下においては、ポリリボヌクレオチド (1) あるいは (2) はほとんど切断活性を示さなかったのに対し、オリゴリボヌクレオチド (5) 存在下では有意な切断反応が確認された。

【0115】

【表 7】

転写中の自己切断反応の速度定数

	k
ポリリボヌクレオチド (1)	N.D.
ポリリボヌクレオチド (1) + オリゴヌクレオチド (5)	0.57 min ⁻¹
ポリリボヌクレオチド (2) + オリゴヌクレオチド (5)	0.78 min ⁻¹

(N.D. ; not detected)

【0 1 1 6】

【発明の効果】

今回構築した活性誘導型ヘアピン型リボザイムは、あるRNAの配列を特異的に認識後、自己切断活性を示す新規なリボザイムである。その認識部位は触媒活性部位とは異なり、離れた部位に位置している。外部から添加された標的RNAが存在しない場合は、リボザイムは不活性な構造をとるため活性を示さない。しかしながら、標的RNA存在下では、そのRNAと結合しリボザイムの構造が活性型に変化し、切断活性が誘導される。この新規リボザイムは、ある標的RNAを配列特異的に認識後触媒活性を示すことより、センサー機能を有したRNA酵素と考えられる。そのため、目的のヌクレオチド配列を有するmRNAを特異的に識別するリボザイムを構築することにより、遺伝子の配列をリボザイムのRNA切断のシグナルに変換することが可能となり、遺伝子の多形検出に応用し得る可能性を有している。本発明は、従来の遺伝子の固定化による遺伝子発現検出において必要な、固定化ならびにPCR法などを要さない新規な遺伝子発現検出法であることから、本発明はより簡便な検出法となることが期待される。

【0 1 1 7】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DNA Chip Research Inc.

Hitachi Software

<120> A Ribozyme for detecting Gene Sequences

<130> 12A139

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 122

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 1

cggcgaattc taatagact cactataggg aaacagagaa gtcaaccaga gaaacaatct 60
gcattcact cgagatgtat attacctggg acccccctga cagtcctggt tggatccagc 120
tc 122

<210> 2

<211> 84

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic RNA

<400> 2

gggaaacaga gaagucaacc agagaaacaa ucugcaucuc acucgagaug uauuuaccu 60
gguaccccccc ugacaguccu guuu 84

<210> 3

<211> 121

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

cggcgaattc taatacgact cactataggg aaacagagaa gtcaaccaga gaaacaatcg 60
catctcactc gagatgtata ttacctggta cccccctgac agtcctgttt ggatccagct 120
c 121

<210> 4

<211> 83

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic RNA

<400> 4

gggaaacaga gaagucaacc agagaaacaa ucgcaucuca cucgagaugu auuuaccug 60
guacccccccu gacaguccug uuu 83

<210> 5

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

cggcgaattc taatacgact cactataggg aaacagagaa gtcaaccaga gaa 53

<210> 6

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6

gagctggatc caaacaggac tgtcaggggg gtaccaggta atatacatct cgagtgagat 60
gcagattggt tctctggtg acttctctg 89

<210> 7

<211> 88

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7

gagctggatc caaacaggac tgtcaggggg gtaccaggta atatacatct cgagtgagat 60
gcgattgttt ctctggttga cttctctg 88

【図面の簡単な説明】

【図 1】

天然のヘアピン型リボザイムの構造を示す。

【図 2】

オリゴヌクレオチドによるリボザイムの活性化の一例を示す。

【図 3】

a. 天然型ヘアピン型リボザイムの構造を示す。ループ A 及び B の相互作用により矢印の位置で切断される。

b. ヘアピンループをランダムにしたものの模式図を示す。小文字は鋳型 DNA 由来の配列であり、クローニング時の制限酵素部位の配列に由来する。

【図 4】

本発明のリボザイムに転写されるヌクレオチド配列を含む DNA を合成によって得る手順を示す。

【図 5】

本発明において使用するインビトロセクション法の手順を示す。

【図 6】

インビトロセクションの各ラウンドにおけるネガティブおよびポジティブセクションの切断率及び各反応の時間を示す。プレセクション 2 は、2 度目のプレセクションを表す。

【図 7】

本発明のリボザイム活性を有する各クローンのオリゴヌクレオチド結合時のヘアピンループの予想構造を示す。

【図 8】

本発明のヘアピン型リボザイムのステムループ三次元構造の不活性型から活

性型への変化を示す。

【図 9】

ポリリボヌクレオチド (1) をコードする鋳型DNAの構築図を示す。

【図 1 0】

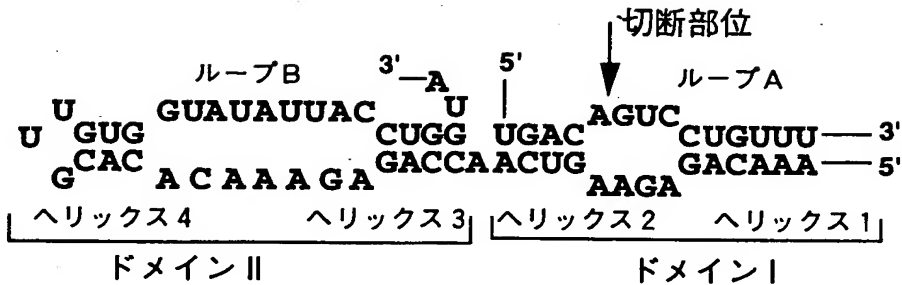
ポリリボヌクレオチド (1) のオリゴヌクレオチド (5) 非存在下および存在下における切断反応のオートラジオグラフィーを示す。

【図 1 1】

オリゴヌクレオチド (5) 共存および非共存下での鋳型DNA 1 からの転写中に生じるポリリボヌクレオチド (1) の自己切断反応を示す。

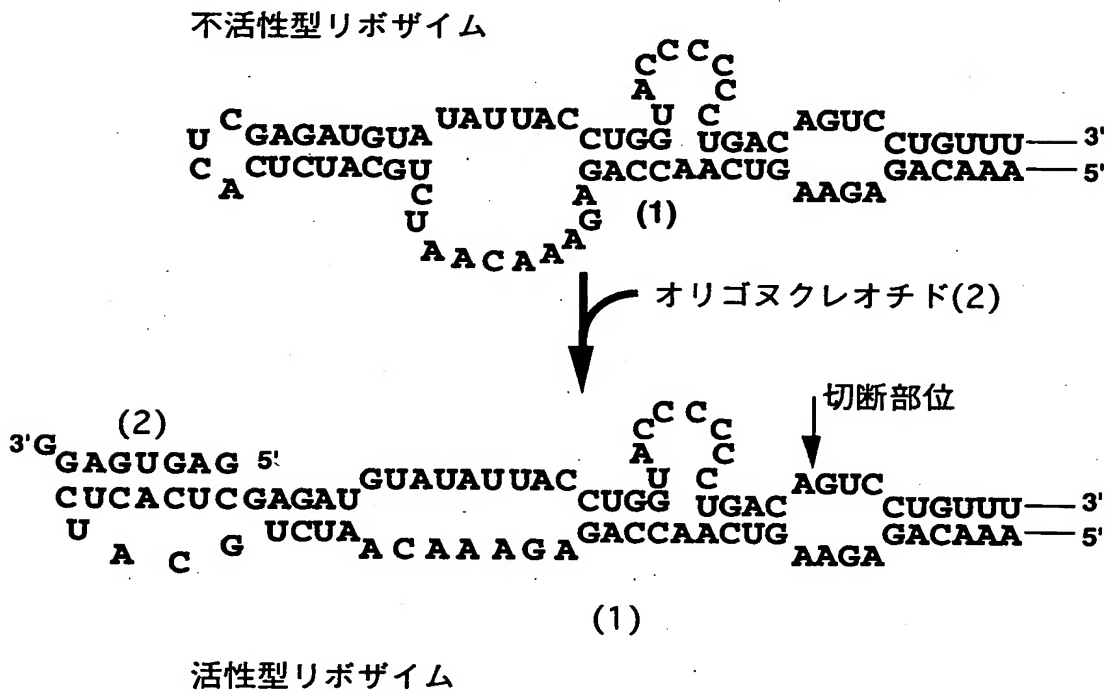
【書類名】 図面

【図 1】

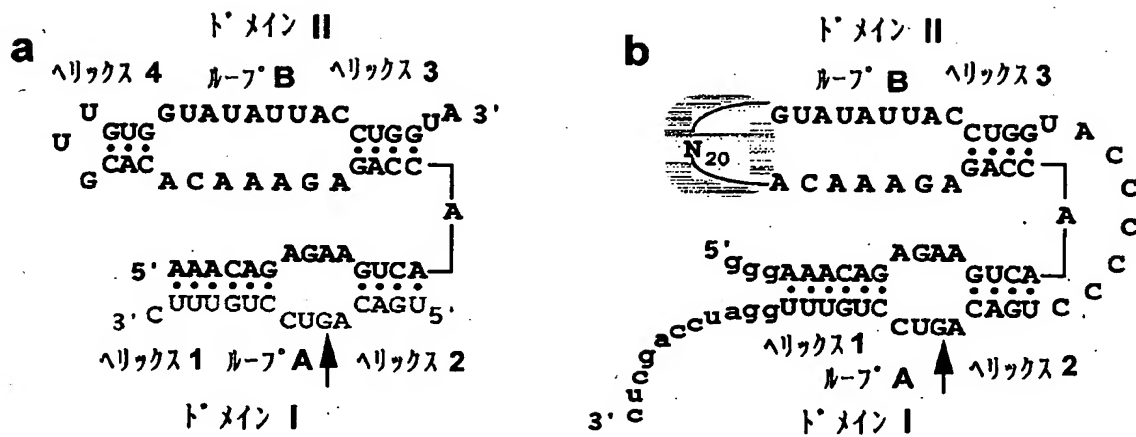


天然のヘアピン型リボザイム

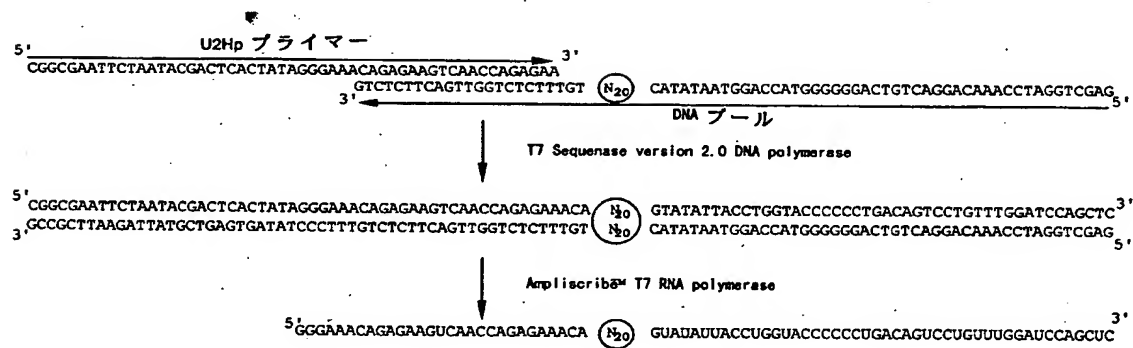
【図 2】



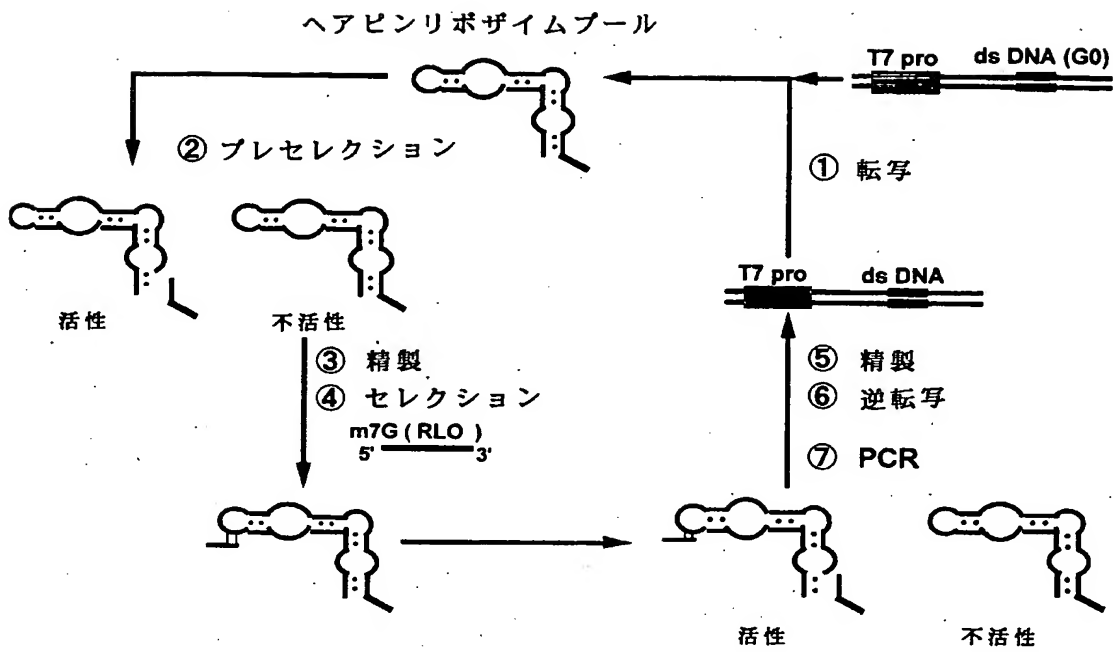
【図 3】



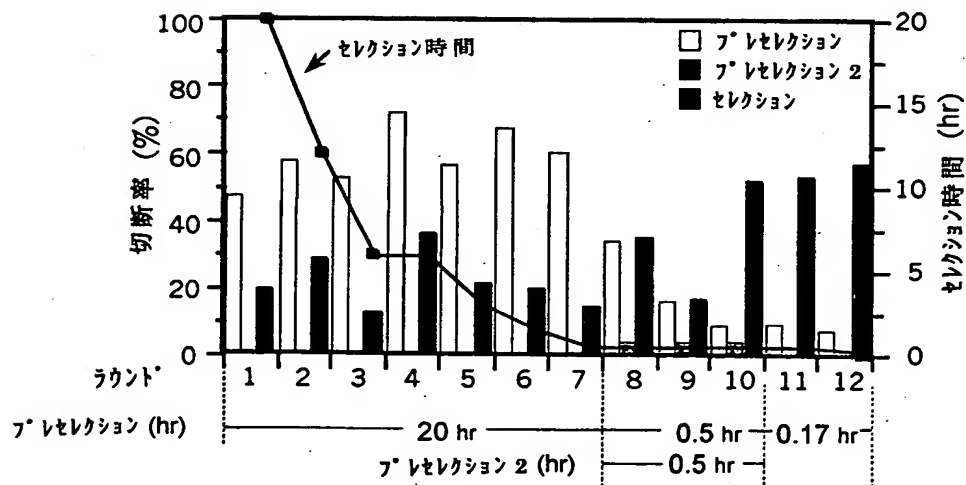
【図 4】



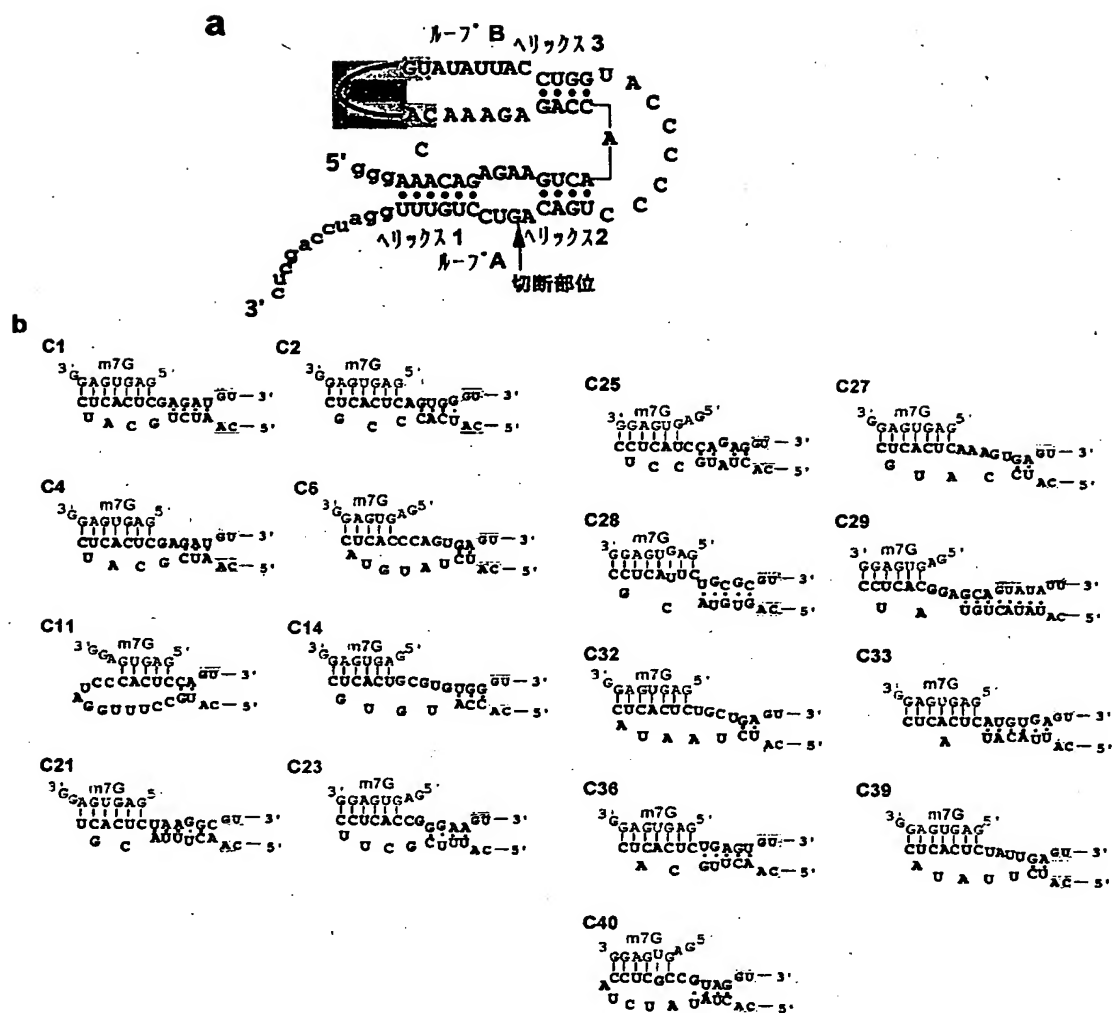
【図 5】



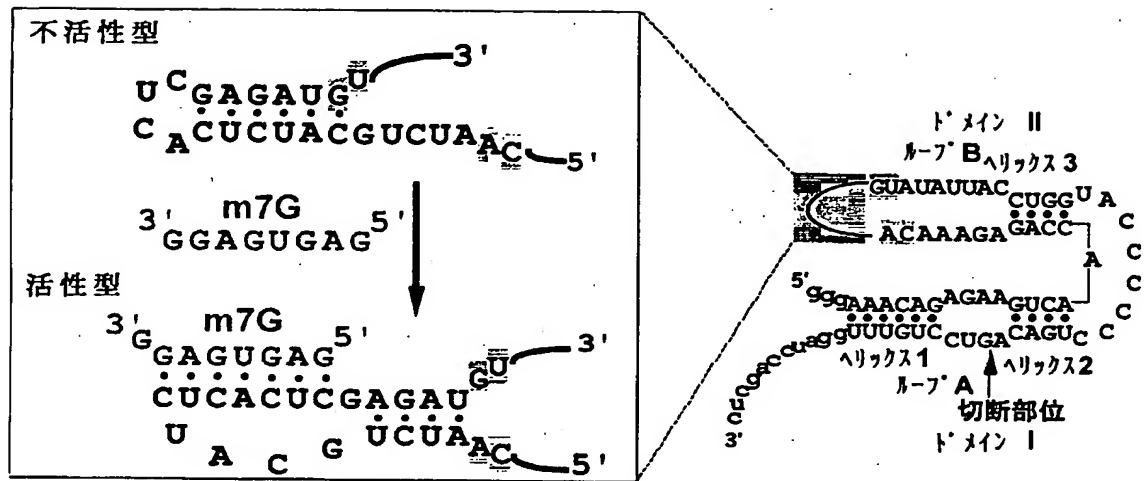
【図 6】



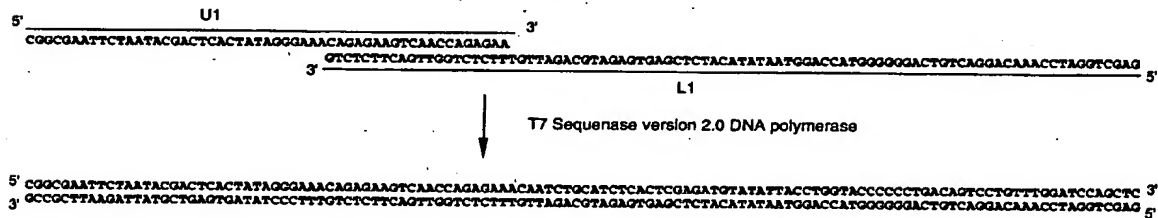
【图 7】



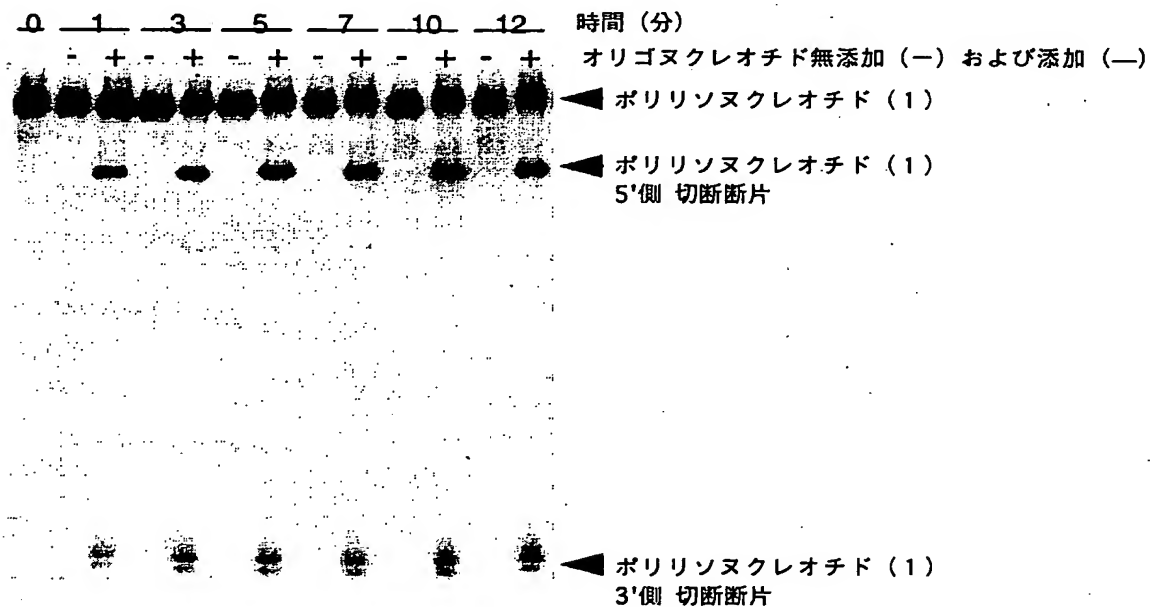
【図 8】



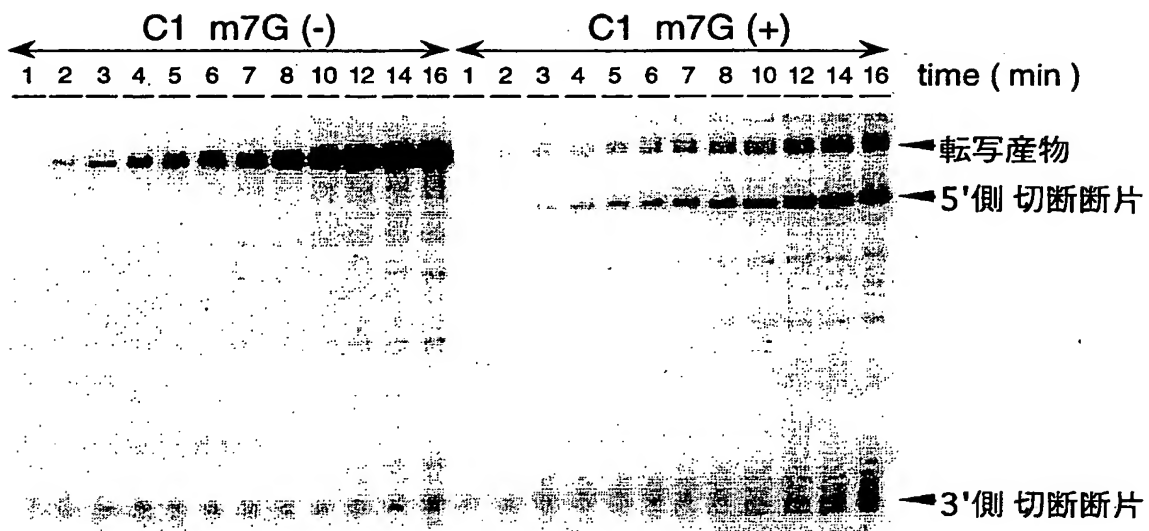
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによるステム－ループ三次元構造の変化により活性化されることを特徴とするヘアピン型リボザイムを提供する。

【効果】 サンプル中の標的塩基配列の有無を検出することができると共に、リボザイム活性を調節することが可能である。

【選択図】 図 1 0

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2000-399155
受付番号	50001695913
書類名	特許願
担当官	東海 明美 7069
作成日	平成13年 1月 9日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	501002172
【住所又は居所】	神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134番
【氏名又は名称】	株式会社ディーエヌエイチップ研究所

【特許出願人】

【識別番号】	000233055
【住所又は居所】	神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
【氏名又は名称】	日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

【代理人】

【識別番号】	100091096
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】	100096183
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	石井 貞次

特2000-399155

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日
[変更理由] 新規登録
住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地
氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

特2000-399155

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[501002172]

1. 変更年月日 2000年12月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134番

氏 名 株式会社ディーエヌエイチップ研究所